

## Tesis Doctoral

# Estudio de las propiedades replicativas in vitro de la cepa A663 de Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) y de la función de la proteína Us3

Ladelfa, María Fátima

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Ladelfa, María Fátima. (2010). Estudio de las propiedades replicativas in vitro de la cepa A663 de Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) y de la función de la proteína Us3. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Ladelfa, María Fátima. "Estudio de las propiedades replicativas in vitro de la cepa A663 de Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) y de la función de la proteína Us3". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REPLICATIVAS *IN VITRO*  
DE LA CEPA A663 DE HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5  
(BoHV-5) Y DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA Us3.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lic. María Fátima Ladelfa**

Director de tesis: Dra. Sonia Alejandra Romera

Director Asistente: Dra. Gabriela Calamante

Consejero de estudios: Dr. Félix Coloumbie

Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2010



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

***IN VITRO* GROWTH PROPERTIES OF BOVINE HERPESVIRUS  
TYPE 5 (BoHV-5) A663 STRAIN AND STUDY OF THE Us3  
PROTEIN FUNCTION.**

Thesis presented to obtain the PhD degree

**Lic. María Fátima Ladelfa**

Director: Dra. Sonia Alejandra Romera

Assistant Director: Dra. Gabriela Calamante

Advisor: Dr. Félix Coloumbie

Institute of Virology, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2010

*A mis papás, que me educan con amor y me transmiten su fortaleza.*

*A Sebastian, que me ayuda a comprender por dónde pasa la vida.*

A la Dra. Alejandra Romera, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio y haberme dado libertad para desarrollarme y crecer profesionalmente.

A la Dra. Gabriela Calamante, por haberme enseñado tanto durante esta etapa, por alentarme siempre y haberme sabido contener en los momentos difíciles. Por su optimismo y por ponerle voluntad, siempre.

Al Dr. Fernando Fernández, por haberme brindado un lugar en el Instituto de Virología y haberme permitido desarrollar ahí mi tesis doctoral.

Al Dr. Andrés Wigdorovitz, por haber intercedido por mi cuando fue necesario.

Al CONICET, por brindarme los medios para iniciarme en el mundo de la ciencia.

Al Dr. Mariano Pérez Filgueira, por haberme escuchado en un momento difícil, por brindarme su ayuda y haber sido parte de una decisión importante.

A los Dres. Patricia Zamorano, Ariel Pereda, María José Dus Santos y Norberto Fondevila, por haberme ayudado y aconsejado a lo largo de estos años.

A Osvaldo Zabal, Teresa Morán y Estela Fernández, por el trabajo excelente que hay detrás de cada pedido de células y por la simpatía con la que siempre me han recibido.

A Marta Radolci y Pamela Angeletti, por el trabajo impecable que realizan.

A Beatriz García Peixoto, Soledad Escudero, Claudia Góngora, Débora Perlo, Ramón Escobar y Marcelo Rivarola, por estar dispuestos a resolver problemas de los más variados, aunque espero no haberles causado muchos...

A Leo Birgy, por cuidar y guardar todas las cosas que me he olvidado, por los mates y las charlas en los días de experimentos largos.

A Fiorella Kotsias, María Paula del Médico Zajac, Ana Laura Zamit y María Mesplet, por toda la ayuda que me brindaron desde el principio hasta el final, por tantas charlas de trabajo y de las otras y por la amistad que nació junto con esta tesis. Gracias por tanta complicidad.

A Sebastián Pappalardo, por sus charlas y sus monólogos, por sus delirios y por todas esas cosas que lo hacen ser tan bueno y tan personaje.

A Dario Malacari, María de los Ángeles Palacios, Silvina Maidana, Daniela Cianfrini, Analía Radl y Carlos Palacios, por la compañía y la ayuda cotidiana y por saber estar en los momentos divertidos y en los otros.

A Diego Compaired, Bessie Craig, Agustina Rimondi, Valeria Olivera, Selene Juliá, Juan Pega, Danilo Buscafusco, Guillermina Stafforini, Juan Pablo Jaworski, Gabriel Pinto, Myriam Trota, Valeria Quattrocchi, Cecilia Langellotti, Carolina Decheneux, Erica Pereyra, Matías Ostrowsky, Ignacio Cebrián, Demián Bellido, Diego González, Andrea Pécora, Sol Pérez

Aguirreburualde, Fernanda González, Mirko Legisa, Marina Mozgovoj, Agustín Ostachuk, Ayelen Sammarruco, Ana Clara Mignaqui, Sebastián Chiavenna, Sabrina Rodríguez, Gabriel Di Stéfano, Marina Lomónaco, Anabel Rodríguez, Gustavo Asenzo, Mariana Domínguez, Gisela Marcopido y Diego Franco, por su presencia cotidiana, por los mates en las oficinas, por las charlas de pasillo o en el ciber, por los almuerzos en lo de Cristina, por los torneos de Gran DT, por tantas vivencias y tan lindos recuerdos.

A Guillermo Maroniche, por tenerme tanta paciencia y por haberme ayudado a visualizar las “hilachas”.

A Andrea Peralta, por su predisposición para ayudarme, aún estando del otro lado de la frontera.

A Silvio Díaz, por cuidar de mis ratones y ayudarme a trabajar con ellos.

A Flavia Zanetti, por recibirme y refugiarme tantas veces en el laboratorio.

A Florencia Ferrer, por ser mi amiga y estar siempre ahí, llena de optimismo.

A Ana María Rodríguez, por ese salpicón de encuentros a lo largo de estos años y por la conexión que mantenemos a pesar de nuestras idas y vueltas.

A Alicia Irizar, Julieta La licata, Laura Zicarelli, Carolina Petit, Jaquelina Conti, Fernanda De Lorenzi, Jimena Puebla y Yanina Calderón, mis amigas de siempre, por su interés y curiosidad, por tantas charlas compartidas y por ser mi cable a tierra.

A Blanca Amor, Guillermo Di Giacomo y sus hijos Verónica, María Eugenia y Martín, por el cariño con el que me han recibido en su familia y el interés que demuestran por mis cosas.

A mis primos Adrián, Mónica y Alejandra Ducet; Candela, Eugenio y Lorenzo Piccioni; Alejandro, Luciana y Pablo Annaratone, Natalia, Julieta y Victoria Ladelfa y a mis tíos, Susana, Ruth, Raul y Carlos Piccioni; Eduardo Ducet, Claudia Lanzani, Cecilia Frias, María del Carmen, Pascual y Pedro Ladelfa, Eduardo Annaratone, Patricia Albamonte y Liliana Tommasi, por su cariño e interés por mi trabajo, más allá de cualquier entendimiento.

A mi abuela Rurra, por preguntarme por mi trabajo en esas esporádicas pero succulentas cenas preparadas con amor.

A mis hermanos, Ezequiel, Nahuel y Facundo, por haberme acompañado a su manera.

A mis papás, Adriana Piccioni y Andrés Ladelfa, por enseñarme a elegir y acompañarme en mis decisiones, por mimarme y tenerme tanta paciencia.

A Sebastián Di Giacomo, por cuidarme tanto, por haberme sabido comprender y no haberme dejado nunca sola.

Resumen	1
<i>Abstract</i>	2
Abreviaturas y siglas	3
Introducción	5
1. Familia <i>Herpesviridae</i>	5
2. Herpesvirus bovino 5	14
3. Interacción de virus con el citoesqueleto	20
4. La proteína Us3 de los alfaherpesvirus	26
Hipótesis	35
Objetivos	36
Materiales y métodos	37
1. Virus y células	37
2. Titulación viral	37
3. Purificación de virus	38
4. Caracterización <i>in vitro</i> de las cepas A663 y N569 de BoHV-5	38
4.1. Obtención de un stock viral de número de pasaje conocido	38
4.2. Cinética de replicación viral	39
4.3. Ensayo de tamaño de placa de lisis	39
4.4. Tinción de las placas de lisis con cristal violeta	40
4.5. Ensayo de tamaño de placa de infección	40
5. Plásmidos	40
6. Cepas bacterianas	41
7. Oligonucleótidos	41
8. Extracción de ácidos nucleicos	43
8.1. Extracción de ADN a partir de virus purificado	43
8.2. Extracción de ARN a partir de células eucariotas	44
9. Metodología del ADN recombinante	44
9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
9.2. Retrotranscripción-PCR (RT-PCR)	44
9.3. Electroforesis para muestras de ácidos nucleicos	46
9.3.1. Electroforesis en geles de agarosa nativos	46
9.3.2. Electroforesis en geles de agarosa desnaturizantes	46
9.4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	46
9.5. Digestión con enzimas de restricción	47
9.6. Desfosforilación de extremos 5' del ADN	47
9.7. Ligación de ADN	47
9.8. Transformación de bacterias competentes	48
9.8.1. Preparación de bacterias competentes	48
9.9. Preparación de ADN plasmídico	49
9.9.1. Purificación rápida de ADN plasmídico para el análisis de construcciones	49
9.9.2. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad	49
10. Secuenciación automática	49

11. Herramientas bioinformáticas	50
12. Análisis de la expresión del gen <i>us3</i>	51
12.1. Análisis de transcritos del gen <i>us3</i> por <i>Northern Blot</i>	51
12.1.1. Hibridación de las membranas de Nylon	51
12.1.2. Marcación de sondas de ADN con fósforo radiactivo	52
12.2. Análisis de la expresión de la proteína Us3	52
12.2.1. Cinética de expresión de la proteína Us3 durante la infección con BoHV-5	52
12.2.1.1. Extracción de proteínas a partir de células infectadas con BoHV-5	52
13. Análisis de proteínas	53
13.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	53
13.2. Detección de proteínas	54
13.2.1. Tinción con el colorante azul de <i>Coomassie</i>	54
13.2.2. Identificación de proteínas mediante <i>Western blot</i>	54
14. Expresión de proteínas en bacterias	55
14.1. Obtención de los plásmidos pRSET-Us3F1 y pREST-Us3F2	55
14.2. Análisis de la expresión de los fragmentos Us3F1 y Us3F2	56
14.3. Análisis en el tiempo de la expresión del fragmento Us3F2	56
14.4. Análisis de la solubilidad del fragmento Us3F2 recombinante	57
14.5. Extracción secuencial de Us3F2	57
14.6. Purificación del fragmento Us3F2 por columna de Ni-NTA	58
15. Producción de suero de ratón específico contra el fragmento Us3F2	58
16. Análisis del suero de ratón específico contra el fragmento Us3F2	59
16.1. <i>Western Blot</i> para detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína Us3F2 recombinante	59
16.2. Inmunocitoquímica para detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína Us3F2 recombinante	59
17. Expresión de las proteínas Us3 y Us3K261D en células eucariotas	60
17.1. Construcción del plásmido pECFP-Us3	60
17.2. Construcción del plásmido pECFP-Us3K261D	60
17.3. Ensayos de transfección transitoria	61
17.4. Análisis de la expresión de las proteínas de fusión Us3-ECFP y pECFP-Us3K261D	61
17.4.1. Inmunodetección por <i>Western Blot</i>	61
18. Estudio de la funcionalidad de la proteína Us3 de BoHV-5 en células eucariotas	62
18.1. Visualización por microscopia de fluorescencia	62
18.2. Marcación del citoesqueleto de actina	62
18.2.1. Microscopía confocal	62
Resultados	64
1. Estudios comparativos <i>in vitro</i> entre las cepas A663 y N569 de BoHV-5	64
2. Estudios tendientes a la caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5	71
2.1. Obtención y secuenciación de los genes codificantes para la proteína Us3 de las cepas A663 y N569 de BoHV-5	71
2.2. Obtención y evaluación de un suero policlonal específico contra la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5	75
2.3. Expresión del gen <i>us3</i> durante la replicación de BoHV-5	79



2.4 Estudio de las modificaciones inducidas por la proteína Us3 de BoHV-5 sobre el citoesqueleto	86
2.5 Evaluación de la relevancia de la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 en los efectos de esta proteína sobre el citoesqueleto de actina	95
Discusión	104
Conclusiones	129
Anexos	130
I. Plásmidos	130
II. Condiciones de reacción y ciclado de PCR	131
III. Predicción de fosforilaciones en la secuencia aminoacídica de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5.	135
Bibliografía	136

# Resumen

**“Estudio de las propiedades replicativas *in vitro* de la cepa A663 de herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) y de la función de la proteína Us3”**

**Resumen**

Este trabajo de tesis contribuyó a la caracterización de la cepa argentina A663 de Herpesvirus Bovino tipo 5 (BoHV-5) mediante el estudio de sus propiedades replicativas *in vitro* y del rol de la proteína Us3.

En el primer caso se realizaron cinéticas de crecimiento y se evaluaron los tamaños de las placas de lisis y de infección de las cepas A663 y N569 de BoHV-5. La producción total de partículas virales infectivas en función del tiempo fue similar entre ambas cepas, sin embargo la cepa A663 resultó menos eficiente en la liberación de partículas virales al medio extracelular y en la dispersión célula a célula, observándose para la cepa A663 una reducción del 90% y del 80% en el tamaño de la placa de lisis y de infección, respectivamente.

Por otro lado, se secuenció la región codificante para la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 y se observó un alto porcentaje de homología con las secuencias correspondientes a otras cepas de BoHV-5. Mediante las técnicas de *Northern* y *Western blot* se demostró que el *gen us3* se expresa tempranamente (desde los 30 minutos post infección) y de manera prolongada (hasta las 48 horas post infección). Los ensayos *in vitro* se realizaron utilizando construcciones que expresaban la proteína Us3 *wt* o una versión mutante de esta proteína que carece de actividad de proteína quinasa, fusionadas a la proteína fluorescente ECFP (US3-ECFP y Us3K261D-ECFP). Se observó que la proteína Us3 de BoHV-5 induce el redondeamiento celular y provoca el desensamblado de las fibras de estrés, siendo estos efectos independientes de su función de quinasa. Además, la proteína mutante Us3K261D disminuyó la formación de proyecciones de celulares y modificó la localización subcelular de la proteína Us3 de BoHV-5.

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron conocer las propiedades replicativas *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5 y constituyeron el primer reporte sobre el estudio de la función de la proteína Us3 de BoHV-5.

Palabras claves: Herpesvirus, BoHV-5, replicación *in vitro*, proteína Us3, fibras de estrés, proyecciones celulares.

# Abstract

**“*In vitro* growth properties of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) A663 strain and study of the Us3 protein function”**

**Abstract**

This thesis contributed to the characterization of the Argentinean bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) A663 strain by studying its *in vitro* growth properties and the function of the Us3 protein.

Firstly, growth kinetics, lysis and infection plaque size assays were performed for BoHV-5 A663 and N569 strains. The total amount of infection virus produced was similar between both strains at each time assayed; however, A663 strain was less efficient than N569 strain in releasing infective viral particles to the extracellular media and in cell-to-cell spread, as shown by a reduction of 90% and 80% in its lysis and infection plaque size, respectively.

On the other hand, the region encoding the Us3 protein of BoHV-5 A663 strain was sequenced and high homology was observed between it and other sequences of BoHV-5 strains. Then, early (from 30 minutes post infection) and prolong (up to 48 hours post infection) expression of *us3* gene was demonstrated by Northern and Western blots assays.

Finally, *in vitro* studies were performed with genetic constructions to express wt Us3 protein or a mutated version of this protein lacking its kinase activity, fused to the fluorescent protein ECFP (Us3-ECFP and Us3K261D-ECFP). In transient transfection assays it was observed that Us3 BoHV-5 protein induced cell rounding and stress fiber breakdown independently of its kinase activity. Besides, the point mutation in the Us3K261D protein reduced cell projections formation and modified the subcellular localization of BoHV-5 Us3 protein.

Taken together, these results allowed the assessment of the *in vitro* growth properties of BoHV-5 A663 strain and constituted the first report of the function of the BoHV-5 Us3 protein.

Key words: Herpesvirus, BoHV-5, *in vitro* growth properties, Us3 protein, stress fibers, cell projections.

## **Abreviaturas y Siglas**

A	alanina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BoHV-1/5	herpesvirus bovino 1 y 5 ( <i>bovine herpesvirus 1/5</i> )
D	ácido aspártico
DICT <sub>50</sub>	dosis infecciosa en cultivo de tejidos 50%
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
dpi	días post infección
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECP	efecto citopático
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EHV-1/2/4	herpesvirus equino 1, 2 y 4 ( <i>equine herpesvirus 1/2/4</i> )
Fig.	figura
g	glicoproteína
G	glicina
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-glucuronidasa
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
hpi	horas post infección
hpt	horas post transfección
HSV-1-2	virus herpes simple 1 y 2 ( <i>herpes simplex virus 1/2</i> )
IR	repetición interna ( <i>internal repeat</i> )
K	lisina
L	leucina
KDa	kilo Daltons
kpb	kilo pares de bases
log <sub>10</sub>	logaritmo en base 10
M	metionina

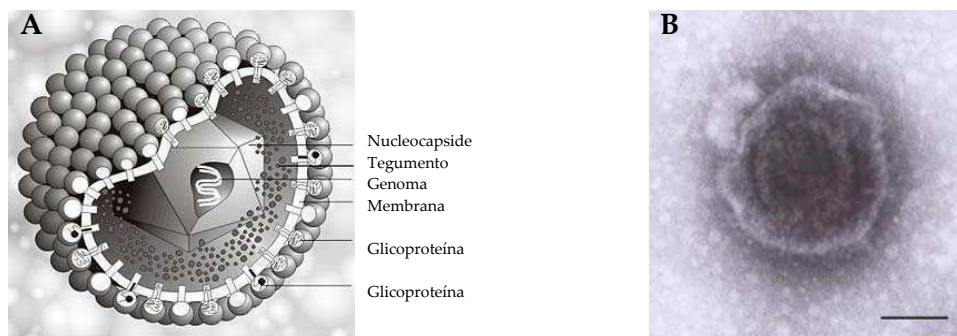
MDV	virus de la enfermedad de Marek ( <i>Marek disease virus</i> )
MOI	multiplicidad de infección ( <i>multiplicity of infection</i> )
ml	mililitros
mM	milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NES	Señal de exportación nuclear ( <i>nuclear export signal</i> )
NLS	Señal de localización nuclear ( <i>nuclear localization signal</i> )
nt	nucleótido
ORF	marco de lectura abierto ( <i>open reading frame</i> )
P	prolina
PAK 1-2	proteínas quinasas activadas por p21
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polimerase chain reaction</i> )
PrV	virus de la pseudorrabia ( <i>pseudorabies virus</i> )
Q	ácido glutámico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
Taq ADN pol	ADN polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TR	repetición terminal ( <i>terminal repeat</i> )
UL	fragmento único largo ( <i>unique long fragment</i> )
US	fragmento único corto ( <i>unique short fragment</i> )
UV	ultravioleta
V	volts
VV	virus vaccinia ( <i>vaccinia virus</i> )
VT	vector de transferencia
VZV	virus varicela zoster ( <i>varicela zoster virus</i> )
µg	microgramos
µl	microlitros



# Introducción

## 1. Familia *Herpesviridae*

La inclusión de cierto virus en la familia *Herpesviridae* está basada en la arquitectura del virión. La misma consiste en un *core* compuesto por ADN lineal doble cadena, una cápside icosaédrica de aproximadamente 100-110nm de diámetro compuesta por 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros), un material amorfo que rodea la cápside denominado tegumento y una envoltura que posee insertas glicoproteínas virales (Roizman *and* Pellet, 2007). En la figura 1 se muestra un esquema de la partícula viral de los herpesvirus y una imagen obtenida por microscopía electrónica de un virión de herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5).



**Figura 1.** A: Representación esquemática de un virión de la familia *Herpesviridae*. Se señalan sus principales componentes: nucleocápside, tegumento, genoma, membrana y glicoproteínas. B: Microscopía electrónica de transmisión de un virión de BoHV-5. La barra indica 100 nm. Imagen extraída de Del Médico Zajac *et al.*, 2009a.

Los herpesvirus comparten cuatro propiedades biológicas significativas:

- 1- El genoma codifica para un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidina quinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa,

ribonucleótido reductasa), en la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y en el procesamiento de proteínas (proteínas quinasas).

2- La síntesis del ADN viral y el ensamblado de la cápside ocurren en el núcleo.

3- La producción de la progenie viral está siempre acompañada por la destrucción de la célula infectada.

4- La capacidad de establecer un estado de latencia en su hospedador natural. En las células que contienen virus latente, el genoma viral se encuentra circularizado y sólo se expresan unos pocos genes virales.

Los miembros de la familia *Herpesviridae* fueron clasificados por el Grupo de Estudio de Herpesvirus perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee on the Taxonomy of Viruses*, ICTV, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>) en tres subfamilias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae*) basándose en las propiedades biológicas de los miembros conocidos hasta ese momento (Roizman *et al.*, 1970; Roizman, 1979). Asimismo, utilizando datos de homología de secuencias de ADN, similitud en la organización genómica y estudios de proteínas virales mediante ensayos inmunológicos, se clasificaron dichos virus en diversos géneros.

A continuación se detallan las principales características de las tres subfamilias de herpesvirus y se mencionan los géneros que las integran.

Los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* se caracterizan por tener un rango variable de hospedador, un ciclo viral de corto tiempo, una rápida diseminación en cultivo de tejidos, una alta eficiencia en la destrucción de las células infectadas, la capacidad de infectar células nerviosas y establecer latencia en ganglios sensoriales (generando un reservorio del virus) e incluso, desarrollar enfermedades neurológicas severas. Esta subfamilia contiene los géneros Simplexvirus, Varicellovirus, Mardivirus, e Iltovirus.

La subfamilia *Betaherpesvirinae* posee un rango restringido de hospedador. El ciclo viral es de largo tiempo y el progreso de la infección en cultivo celular es lento. El virus puede mantenerse en estado de latencia en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos. Esta subfamilia esta compuesta por los géneros Citomegalovirus, Muromegalovirus y Roseolovirus.

El rango de hospedador experimental de los miembros de la subfamilia *Gamaherpesvirinae* esta limitado a la familia u orden a la cual pertenece el hospedador natural. *In vitro*, todos los miembros replican en células linfoblásticas y algunos también causan infecciones líticas en células epiteliales y fibroblásticas. Los virus de esta subfamilia son usualmente específicos de linfocitos T y B y se ha demostrado virus latente en tejidos linfoides. Esta subfamilia contiene los géneros Limfocriptovirus y Rhadinovirus.

Los alfaherpesvirus constituyen la mayor subfamilia dentro de los herpesvirus y contienen diferentes patógenos relacionados de humanos y animales, algunos de los cuales se detallan en la siguiente tabla:

<i>Alfaherpesvirinae</i>				
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Hospedador Natural</b>
<i>Simplexvirus</i>	Virus herpes simple 1	HSV-1	Herpes labial	Hombre
	Virus herpes simple 2	HSV-2	Herpes genital	Hombre
<i>Varicellovirus</i>	Herpes suid 1 (Virus de la pseudorrabia)	PrV	Enfermedad de Aujeszky	Cerdos
	Herpesvirus bovino 1	BoHV-1	Rinotraqueitis infecciosa bovina	Bovinos
	Herpesvirus bovino 5	BoHV-5	Meningoencefalitis	Bovinos
	Herpesvirus equino 1	EHV-1	Encefalitis y abortos	Equinos
	Herpesvirus equino 4	EHV-4	Rinoneumonía equina	Equinos
	Virus de varicela zoster	VZV	Varicela	Hombre
	Herpesvirus felino 1	FeHV-1	Rinotraqueitis viral felina	Gato
<i>Mardivirus</i>	Virus de la enfermedad de Marek 1	MDV-1	Enfermedad de Marek	Aves de corral
	Virus de la enfermedad de Marek 2	MDV-2	Infección asintomática	Aves de corral
	Herpesvirus de pavo	HTV	Infección asintomática	Pavos
<i>Iltovirus</i>	Herpesvirus gallid 1	GaHV-1	Laringotraqueitis infecciosa	Aves de corral

A continuación se describen los eventos que ocurren durante el ciclo de replicación de los alfaherpesvirus. Los conocimientos existentes en su mayoría provienen de estudios realizados con Virus Herpes Simple 1 (HSV-1), prototipo de los alfaherpesvirus. Asimismo, se hará especial hincapié en los trabajos realizados con diversos alfaherpesvirus de importancia ganadera como el Virus de la Pseudorrabia (PrV), Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5) y Herpesvirus Equino 1 (EHV-1).

La infección de células permisivas se inicia con el ingreso de la partícula viral. Inicialmente ocurre el pegado lábil de las glicoproteínas virales B y C (gB y gC) a los glicosaminoglicanos celulares (Li *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1992, 1994; Mettenleiter *et al.*, 2002; Okasaki *et al.*, 1991, 1993, 1994). Luego, se produce la unión estable de la glicoproteína D (gD) a un receptor celular (*herpesvirus entry mediator A*, HveA, HveB, HveC, HveD y *3-O-sulfated heparan sulfate*, 3-O-S HS) (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000; Spear *et al.*, 2003). Finalmente, la fusión de la envoltura viral con la membrana celular lleva a la entrada definitiva del virión. Este proceso es mediado por las glicoproteínas gB (Gerdt *et al.*, 2000), el complejo formado entre las glicoproteínas H y L (gH/gL) (Meyer *et al.*, 1998) y gD (Liang *et al.*, 1995; Reske *et al.*, 2007). El mecanismo de fusión no ha sido completamente dilucidado, excepto que la unión de gD con receptores específicos debe ocurrir previamente a la fusión (Spear *et al.*, 2006).

Una vez dentro del citoplasma ocurre el transporte de las cápsides hacia el núcleo celular. Según estudios realizados con HSV-1, las cápsides se unen a la dineína de los microtúbulos a través de las proteínas del tegumento UL34 y UL31 (Dhoner *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2000) y/o VP26 (Antinone *et al.*, 2006). La entrada del ADN viral al núcleo ocurre a nivel de los poros de la envoltura nuclear, donde las cápsides liberan el ADN. Al ingresar al núcleo el ADN se circulariza sin necesidad de expresión de proteínas virales (Fraefel *et al.*, 1993; Garber *et al.*, 1993).

Mientras las cápsides son transportadas al núcleo, algunas de las proteínas del tegumento son vertidas en el citoplasma, donde tendrían un rol importante en las etapas tempranas de la infección. La proteína VP8 es la más abundante de BoHV-1 (Carpenter *et al.*, 1991; van Drunnen Littel-van der Hurk *et al.*, 1995) y se dirige hacia el núcleo gracias a una secuencia de localización nuclear (Zheng *et al.*, 2004). Para HSV-1, se sugiere que esta proteína tiene la capacidad de unirse a ARN, co-localiza en el núcleo con bICP4 (*bovine infected cell protein 4*), principal transactivador viral, y se comprobó *in vivo* que se une al menos a un transcripto viral, bICP0 (Donnelly *et al.*, 2007). El producto del gen UL41, otra proteína del tegumento, es responsable en BoHV-1 de la supresión de la síntesis de proteínas celulares mediante la degradación de los ARN mensajeros (Koppers-Lalic *et al.*, 2001). La

proteína VP16, conocida también como  $\alpha$ -TIF (factor transactivador de genes  $\alpha$ ) es la responsable de la iniciación de la transcripción de los genes virales, transactivando a los genes inmediato-tempranos (*immediate early*, IE, genes  $\alpha$ ). Sin embargo, no todas las proteínas del tegumento se desprenden de la cápside durante el ingreso y se demostró que al menos los productos de los genes UL36, UL37 y Us3 se mantienen asociados a la cápside hasta su anclaje a la membrana nuclear (Granzow *et al.*, 2005).

La transcripción del ADN viral comienza en el núcleo por acción de la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora. La expresión génica está regulada temporalmente a lo largo de la infección por un sistema de “encendido y apagado” (*on-off*) que activa e interrumpe la lectura secuencial de los genes (Honess *and* Roizman, 1974). Durante la cascada de transcripción pueden distinguirse tres grupos de genes virales dependiendo del momento de la infección en la cual se expresan: los genes  $\alpha$  o genes inmediatos tempranos (*immediate early*, IE), los genes  $\beta$  o genes tempranos (*early*, E) y los genes  $\gamma$  o genes tardíos (*late*, L), que codifican proteínas involucradas principalmente en la regulación del ciclo viral, en la replicación del ADN viral y en la morfogénesis de nuevos viriones, respectivamente.

Desde el momento en que el ADN viral entra al núcleo, ciertas proteínas del tegumento, como la proteína VP6, interactúan con componentes transcripcionales celulares de manera de estimular la transcripción de los genes IE *bICP0*, *bICP4* y *bICP22*. Una vez producidas en el citoplasma, estas proteínas son importadas al núcleo donde provocaran la disminución de la expresión de los genes  $\alpha$  y la activación de los genes  $\beta$  y  $\gamma$ .

Las proteínas codificadas por los genes  $\beta$  presentan su pico de expresión entre las 4 y 8 horas post infección. Las mismas están implicadas en el metabolismo de nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. Este último proceso origina concatémeros, una gran molécula de ADN constituida por muchos genomas ligados covalentemente cabeza-cola (Hammerschmidt *et al.*, 1988). Los concatémeros poseen una estructura altamente ramificada cuyo origen no puede explicarse por el modelo de replicación de círculo rodante (Bataille *and* Epstein, 1997). Se ha sugerido que eventos de recombinación, muy frecuentes dentro de los herpesvirus, participarían en la formación de tal estructura (Severini *et al.*, 1996).

Existen dos grupos de genes  $\gamma$ , los genes  $\gamma$  1 o tardíos precoces, que presentan una expresión aumentada por la síntesis del ADN viral; y los genes  $\gamma$  2, o tardíos propiamente dichos, cuya expresión es totalmente dependiente de la síntesis de ADN viral. Las proteínas estructurales (cápside, tegumento, envoltura), codificadas por los genes  $\gamma$ , se producen en gran cantidad en el citoplasma o en el retículo endoplasmático. Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las nuevas cápsides. Los genes  $\gamma$  codifican para las glicoproteínas virales, de las cuales gB, gD, gH, gK y gL son esenciales para lograr una infección productiva en cultivo de tejidos y para la entrada de partículas virales extracelulares a las células, mientras que gC, gE, gI, gG, gJ, gM y gN, son consideradas no esenciales (Davison *et al.*, 2002; Dingwell *et al.*, 1995).

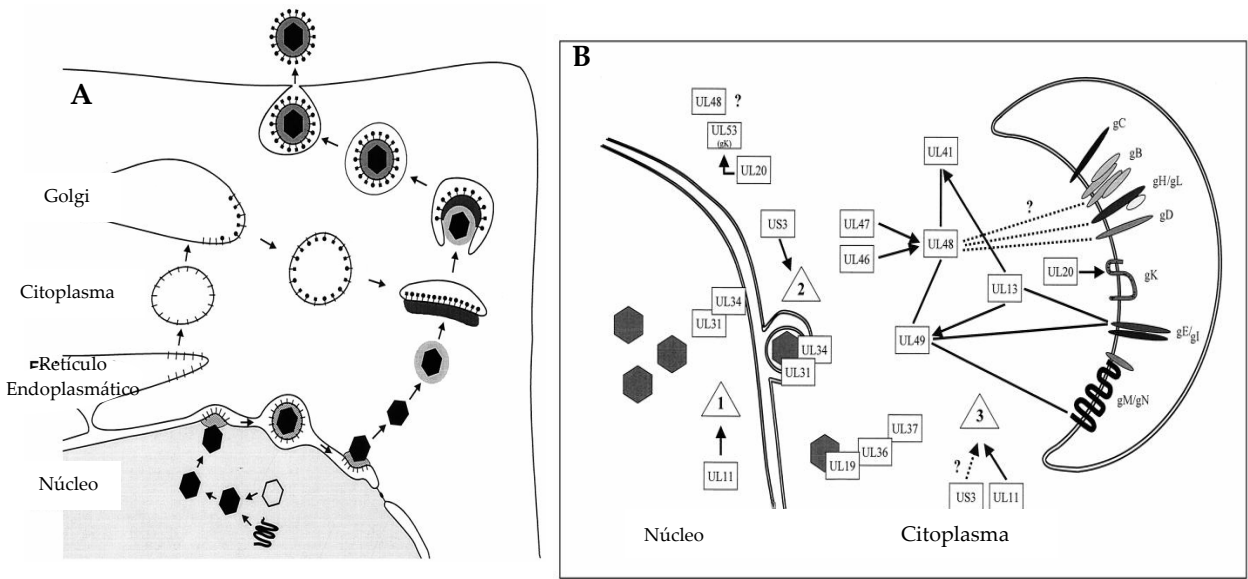
El ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del ADN ocurren en el núcleo de las células infectadas. Este proceso es muy complejo e involucra diversos pasos ordenados: el ensamblaje de los 162 capsómeros ocurre sobre un esqueleto de proteínas de *andamiaje* (*scaffold*) (Homa and Brown, 1997); luego, el ADN concatémico es clivado en unidades genómicas por un complejo mecanismo y estas se empaquetan en la cápside simultáneamente con el desprendimiento de la estructura de *andamiaje* (Klupp *et al.*, 2006; Schynts *et al.*, 2002), lo cual estabilizaría las cápsides virales (Roos *et al.*, 2009).

La maduración y la salida de los viriones del núcleo se producen luego de la encapsidación del genoma viral. Se han sugerido tres hipótesis para explicar los mecanismos involucrados en el trayecto que realizan los viriones para atravesar la barrera núcleocitoplasmática así como para la adquisición del tegumento y la envoltura. La primer hipótesis propone que los viriones conservan la envoltura adquirida en la membrana interna nuclear durante todo el trayecto a través del retículo endoplasmático y el aparato secretorio hasta el exterior celular (modelo luminal) (Campadelli-Fiume *et al.*, 1991; Enquist *et al.*, 1998). El segundo modelo, llamado *envelopment-deenvelopment-reenvelopment* (revisado en Mettenleiter, 2006a, b), propone que la envoltura primaria se adquiere cuando las cápsides conteniendo el ADN brotan por la membrana nuclear interna hacia el espacio periplásmico (*envelopment*). Luego, se fusiona la envoltura primaria con la membrana nuclear externa trasladando las cápsides desnudas al citoplasma (*deenvelopment*). Una vez en el citoplasma las



cápsides adquieren el tegumento maduro y la envoltura final (con las glicoproteínas insertas) al ingresar por brotación a vesículas del *trans* Golgi (*reenvelopment*) (Granzow *et al.*, 2001; Mettenleiter, 2002, 2004, 2006) (Fig. 2A). En los últimos años, se ha propuesto un tercer mecanismo tanto para HSV-1 como para BoHV-1 (Leuzinger *et al.*, 2005; Wild *et al.*, 2005). Estos trabajos sugieren que las cápsides desnudas salen del núcleo por poros “ensanchados” y adquieren la envoltura al ingresar a las cisternas del Golgi o vacuolas derivadas del Golgi. En todos los casos, las vesículas del Golgi conteniendo viriones maduros son transportadas hacia la membrana plasmática y luego de fusionarse la membrana de la vesícula con la membrana celular se liberan los viriones al medio extracelular.

Según el modelo *envelopment-deenvelopment-reenvelopment* la morfogénesis de los viriones ocurre en compartimientos subcelulares distintos e involucra distintas proteínas virales (revisado en Mettenleiter, 2006) (Fig. 2B). Así, en la adquisición de la envoltura primaria es necesaria la interacción entre las proteínas UL31 y UL34, que forman parte de los viriones primarios pero están ausentes en las partículas maduras (Fuchs *et al.*, 2002). En ausencia de éstas proteínas las cápsides intranucleares no alcanzan la membrana nuclear interna para comenzar el proceso de adquisición de la envoltura primaria. En HSV-1 también es necesaria la fosforilación de UL31 por Us3 para completar dicho proceso (Mou *et al.*, 2009). La proteína Us3, presente tanto en viriones primarios como maduros de PrV (Granzow *et al.*, 2004) y HSV-1 (Reynolds *et al.*, 2002) está involucrada en la pérdida de la envoltura primaria, ya que en su ausencia viriones envueltos se acumulan en el espacio perinuclear (Klupp *et al.*, 2001). En HSV-1, gB y gH actúan de manera redundante para promover la fusión entre la envoltura primaria viral y la membrana externa nuclear. La fosforilación de la cola citoplasmática de gB por parte de Us3 sería el evento central del proceso de fusión en HSV-1 (Wisner *et al.*, 2009).



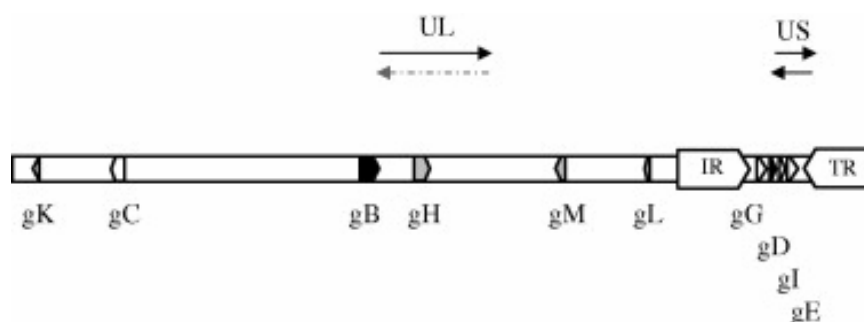
**Figura 2: A:** Esquema de la vía de egreso de los herpesvirus propuesta por el modelo *envelopment-deenvelopment-reenvelopment*. **B:** diagrama de las interacciones proteicas involucradas en la formación de viriones en HSV-1 y PrV. Las líneas sólidas o contactos directos entre rectángulos indican interacciones físicas mientras que las flechas indican efectos funcionales. Las líneas punteadas y los signos de pregunta indican interacciones o participaciones proteicas sugeridas. Paso 1: adquisición de envoltura primaria. Paso 2: pérdida de la envoltura. Paso 3: adquisición de envoltura secundaria. Figuras y leyendas extraídas y adaptadas de Mettenleiter, 2002.

Luego de la fusión entre la envoltura y la membrana nuclear externa, las nucleocápsides son liberadas al citoplasma llevando las proteínas UL36, UL37 y Us3 (Fuchs *et al.*, 2002). La adquisición del resto del tegumento y la envoltura secundaria por brotación en vesículas del sistema *trans* Golgi depende de la interacción de varias proteínas virales. Allí se incorporan otras dos proteínas del tegumento, UL11 y UL49. UL49 interactúa con la cola citoplasmática de gE y gM en PrV (Fuchs *et al.*, 2002) y gH en HSV-1 (Gross *et al.*, 2003) y su ausencia produce la acumulación de cápsides en el citoplasma (Brack *et al.*, 1999, 2000). Esto mismo ocurre luego de la delección de UL11 y gM en PrV (Kopp *et al.*, 2004) y en HSV (Leege *et al.*, 2009). Asimismo, este fenotipo se observa luego de la delección de gE y gD en HSV-1 (Farnsworth *et al.*, 2003), mientras que la delección de sólo una de estas glicoproteínas no muestra alteraciones en la adquisición de la envoltura secundaria y en el egreso de los viriones (Lee *et al.*, 2009).

Finalmente, la adquisición de la envoltura secundaria y el direccionamiento a las membranas de las células infectadas se produce por la acción de glicoproteínas virales que se encuentran en las membranas de las vesículas derivadas del Golgi de manera aún no esclarecida. Sin embargo, se supone que existe cierta redundancia en la participación de distintas glicoproteínas en este proceso.

## 2. Herpesvirus bovino 5

El herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) pertenece a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Posee un genoma de ADN doble cadena, organizado en una región única larga (UL) y una región única corta (US) la cual se encuentra flanqueada por las repeticiones invertidas interna (IR) y terminal (TR) (Roizman *and* Pellet, 2001) (Fig. 3). El genoma de BoHV-5 contiene 138,4 kpb y codifica para 72 *open reading frames* (ORFs) (Delhon *et al.*, 2003, acceso GenBank AY261359) que son homólogos a los de HSV-1 (prototipo de los alfaherpesvirus). El genoma de BoHV-5 codifica para diez glicoproteínas; seis de ellas están en la región UL: gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1); y las cuatro restantes se encuentran en la región US: gG (US4), gD (US6), gI (US7) y gE (US8). La proteína codificada por el gen UL49.5 (gN) es considerada como una falsa glicoproteína ya que no está glicosilada (Liang *et al.*, 1996).



**Figura 3:** Representación esquemática del genoma de BoHV-5. Se muestran las regiones únicas larga (UL) y corta (US) y se indican con flechas sus posibles orientaciones. La región US está flanqueada por dos secuencias repetidas e invertidas (repeticiones interna y terminal, IR y TR, respectivamente). La región UL tiene una longitud de 104.054 pb, la región US de 9.548 pb y las IR y TR tienen una longitud de 12.109 pb cada una. Se indican la localización y orientación de los genes codificantes para las glicoproteínas. Figura extraída de Del Médico Zajac *et al.*, 2009a.

BoHV-5 fue aislado de casos de meningoencefalitis fatal en bovinos (Bagust, 1972b; French, 1962) y fue considerado inicialmente como el subtipo encefalítico de BoHV-1 (BoHV-1.3). En el año 1992, el Comité Internacional de Taxonomía Viral, basándose en la información obtenida a partir de ensayos de mapeo del genoma viral con enzimas de restricción (Brake and Studert, 1985; Engels *et al.*, 1986), de neutralización cruzada (Bagust *et al.*, 1972a; Metzler *et al.*, 1986) y de reactividad frente a anticuerpos monoclonales (Friedli and Metzler, 1987; Metzler *et al.*, 1986), reconoció al BoHV-1.3 como un virus diferente, al cual se lo denominó BoHV-5 (Roizman *et al.*, 1992).

Los brotes causados por BoHV-5 son esporádicos y presentan una distribución geográfica limitada, detectándose principalmente en el hemisferio sur (D'Arce *et al.*, 2002). Pocos casos de encefalitis asociada a BoHV-5 han sido reportados en Australia (French, 1962; Johnston *et al.*, 1962), América del Norte (Barenfus *et al.*, 1963; Eugster *et al.*, 1974; Reed *et al.*, 1973) y Europa (Bartha *et al.*, 1969; Moretti *et al.*, 1964). En los últimos años sólo se han reportado casos de meningoencefalitis asociada a BoHV-5 en Brasil y Argentina. En Brasil se han presentado casos en las regiones Norte (Riet-Correa *et al.*, 2006), Centro-Oeste (Colodel *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 1998) Sud-Este (Gomes *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 1998) y Sur (Elias *et al.*, 2004; Halfen *et al.*, 2000; Rissi *et al.*, 2006). En cuanto a la Argentina, los datos disponibles son escasos. En este sentido, el trabajo más reciente pertenece a Pérez *et al.* (2003), en el cual

se analizaron muestras con diagnóstico de necrosis cerebrocortical (1970-1999) y se encontró que el 47,4 % de los casos eran positivos a BoHV-5. Sin embargo, en los últimos años se han reportado nuevos casos de meningoencefalitis en nuestro país a partir de los cuales ha sido posible aislar BoHV-5. El último aislamiento de BoHV-5 realizado hasta el momento, se obtuvo a partir de un caso de meningoencefalitis ocurrido en la provincia de Buenos Aires en el año 2007 (Romera, comunicación personal).

La seroprevalencia real de BoHV-5 es desconocida tanto en Brasil como en Argentina debido a la alta prevalencia de anticuerpos específicos contra BoHV-1 inducidos por la vacunación y/o infección, y la falta de un ensayo serológico que permita diferenciar entre animales positivos a BoHV-1 y a BoHV-5.

En base al patrón de restricción generado por endonucleasas sobre el genoma viral, BoHV-5 se clasifica en los subtipos a, b y no-a-no-b, siendo las cepas N569 (de origen australiano), A663 (de origen argentino) y aislamientos brasileiros de campo, los prototipos de estos subtipos respectivamente (D'Arce *et al.*, 2002). A pesar de la proximidad geográfica entre Argentina y Brasil, la mayoría de los aislamientos brasileiros de campo recientemente estudiados pertenecen al subtipo a (D'Arce *et al.*, 2002). El escaso número de aislamientos de BoHV-5 obtenidos y caracterizados hasta el momento podría ser la causa de las discrepancias entre los subtipos circulantes en Argentina y Brasil. Además, podría ocurrir que los aislamientos que han sido analizados hasta el momento, no representen los subtipos de prevalencia actual en estos países.

Luego de ingresar por vía intranasal, BoHV-5 replica en las mucosas respiratorias y en las tonsilas durante aproximadamente 5 días. Durante este período se produce la mayor excreción viral, la cual va disminuyendo hacia los 10-12 días, aproximadamente. Luego el virus se disemina a las conjuntivas y llega al ganglio trigémino por transporte axonal en donde establece latencia. El ADN viral se mantiene latente en las neuronas probablemente durante todo el transcurso de la vida del animal. El estrés ocasionado por transporte o parto, o la administración de glucocorticoides, pueden inducir la reactivación de la infección latente

con la consecuente signología y excreción viral (Cascio *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002).

La infección de bovinos con BoHV-5 puede ocasionar enfermedad neurológica denominada meningoencefalitis. Dependiendo de la cepa viral y de la edad y estado inmunológico del animal infectado, el curso de la enfermedad puede ser subclínico, leve o fatal. Los primeros signos detectados consisten en depresión, anorexia y debilidad general. Luego se observan signos nerviosos como incoordinación, ceguera, temblores musculares, marcha en círculo, cabeza apoyada contra bebederos o alambrados, convulsiones, pedaleo y muerte, que puede producirse luego de 5 días de haber detectado los primeros signos (Barenfus *et al.*, 1963; Bartha *et al.*, 1969; Carrillo *et al.*, 1983a, b; Del Médico Zajac *et al.*, 2006; Gardiner and Nairn, 1964; Riet-Correa *et al.*, 1989). En algunos brotes de meningoencefalitis asociada a BoHV-5, se observó secreción nasal y ocular previa a la aparición de signos nerviosos (Bartha *et al.*, 1969; Carrillo *et al.*, 1983b; Schudel *et al.*, 1986), y temperatura elevada (entre 40°C y 42°C) (Carrillo *et al.*, 1983a, b; Schudel *et al.*, 1986). La tasa de mortalidad por infección con BoHV-5 puede alcanzar el 10%, mientras que la tasa de letalidad frecuentemente supera el 90% (Giraud, 1989).

Hasta el momento no existen estudios sobre los factores que influyen en el contagio o la incidencia de las infecciones con BoHV-5. Los bovinos son susceptibles desde el nacimiento hasta aproximadamente los 18 meses (Schudel *et al.*, 1986), pero la mayoría de los casos fatales se observaron en animales de 5-7 meses (Barenfus *et al.*, 1963; Carrillo *et al.*, 1983a). Las infecciones de animales menores de 6 meses pueden alcanzar una letalidad del 100% (Carrillo *et al.*, 1983a; Meyer *et al.*, 2001; Schudel *et al.*, 1986), mientras que los animales adultos pueden desarrollar signos leves o una infección subclínica (Ashbaugh *et al.* 1997; Cascio *et al.*; 1999; Vogel *et al.*, 2003) estableciendo una infección latente en los ganglios sensoriales (Cascio *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2002). Los procesos de latencia y reactivación son de fundamental importancia a nivel de la virulencia y la patogenia de los alfa herpesvirus dado que el genoma viral latente no puede ser eliminado del hospedador infectado (Muyllkens *et al.*, 2003). Un hospedador latentemente infectado constituye un reservorio natural del virus. Asimismo, se han reportado casos de latencia doble: neuronas humanas

portando infección latente con HSV-1 y VZV (Varicela Zoster Virus) (Theil *et al.*, 2003) y bovinos latentemente infectados con 2 cepas de BoHV-1 (Whetstone *and* Miller, 1989).

Una vez producida la infección primaria con BoHV-5, la primer respuesta del hospedador está constituida por reacciones inflamatorias y celulares no específicas (Babiuk *et al.*, 1996). Algunos de los mecanismos no específicos son constitutivos, como el sistema de complemento, mientras que otros son inducidos por la replicación del virus dentro de las células, como la síntesis de interferones ( $\alpha/\beta$ ), los cuales modulan el tráfico y el reclutamiento de células efectoras, como los macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y células NK (*natural killer*) al sitio de infección (Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1991; Griebel *et al.*, 1987, 1989). Estas células inducen la secreción de citoquinas tempranas, las cuales inician la respuesta inflamatoria, reclutan y activan las células inflamatorias, e inician y regulan la respuesta inmune específica (Campos *et al.*, 1994).

Debido a la amplia similitud antigénica entre BoHV-5 y BoHV-1 y a la falta de estudios sobre la respuesta inmune asociada a la infección con BoHV-5, se asume que para ambos virus estarían involucrados los mismos mecanismos. La respuesta inmune celular específica es detectada a partir del día 5 pi y alcanza la actividad máxima a los 7-10 dpi. Esta respuesta correlaciona con la recuperación de la infección y es previa a la aparición de niveles significativos de anticuerpos (Babiuk *et al.*, 1996; Romera *et al.*, 2001). Los linfocitos T colaboradores median la lisis de las células infectadas a través de la secreción de IFN  $\gamma$  e IL-2 que activan a macrófagos y células NK, y reclutando e induciendo la proliferación de linfocitos T citotóxicos.

La respuesta inmune humoral puede ser detectada a partir del día 10 pi aproximadamente (Del Médico Zajac *et al.*, 2006; Romera *et al.*, 2001). La respuesta de anticuerpos es considerada más importante en la prevención de la infección que en la recuperación de la misma (Babiuk *et al.*, 1996). Los anticuerpos pueden neutralizar partículas virales extracelulares e inhibir su dispersión (por ejemplo en las superficies de mucosas), y, por otro lado, participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Rouse *and* Babiuk, 1974). Se presume que la inmunidad humoral persiste de por vida

aunque no de manera protectiva, ya que los animales infectados pueden reinfectarse. Los anticuerpos maternos se transfieren al ternero por el calostro y lo protegen de la enfermedad (Mechor *et al.*, 1991). Estos anticuerpos tienen una vida media de tres semanas aunque pueden seguir detectándose hasta los seis meses de vida.

El diagnóstico de la enfermedad causada por BoHV-5 puede presumirse sobre la base de los signos clínicos, histopatológicos y epidemiológicos. Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere la identificación del agente infeccioso, de sus componentes, y/o la detección de los anticuerpos específicos que éste induce. En la práctica veterinaria de nuestro país ha comenzado recientemente a realizarse la diferenciación entre BoHV-5 y BoHV-1 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dus Santos, comunicación personal).

El aislamiento de BoHV-1 o BoHV-5 a partir de muestras de un animal no confirma que el cuadro observado sea consecuencia de la acción de estos agentes. Por lo tanto, la serología, en especial la seroconversión, permitirá completar el diagnóstico, ya que las pruebas disponibles actualmente, seroneutralización y ELISA, no discriminan entre anticuerpos específicos contra BoHV-1 y BoHV-5, ni entre anticuerpos vacunales y anticuerpos producidos durante la infección.

Debido a que el estado de latencia es una consecuencia de la infección con estos agentes, cualquier animal con anticuerpos debe considerarse como un portador y potencial fuente de infección por la posible excreción intermitente del virus al ambiente.

En regiones donde se registra un alto número de animales infectados con BoHV, la estrategia elegida para el control de las infecciones es la vacunación. La vacunación debe lograr diferentes niveles de protección desde reducción de la patogenia y la transmisión del virus, hasta la prevención y la erradicación (van Drunen Littel-van den Hurk, 2006).

Dado que los casos de infecciones con BoHV-5 están acotados geográficamente y se presentan con baja frecuencia, no existen estudios focalizados en el desarrollo de vacunas contra este virus. Sin embargo, ha sido probado que la inmunidad conferida por la



vacunación contra BoHV-1 también protege a los animales frente a la infección con BoHV-5 (Del Médico Zajac *et al.*, 2006).

Las vacunas para BoHV-1 se clasifican en cuatro tipos: vivas modificadas, inertes (virus completo inactivado o subunidades), génicas y basadas en vectores. Asimismo, si se plantea como objetivo la erradicación del virus, es necesario contar con vacunas que sean protectivas y que permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Para ello, se desarrollaron vacunas marcadoras o DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*), basadas en subunidades virales (proteínas virales inmunogénicas) o cepas virales con deleciones en genes no esenciales (por ejemplo las cepas BoHV-1gE-) (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006). En la actualidad, en EEUU y países de Latinoamérica, se utilizan las vacunas convencionales de BoHV-1, es decir, virus completo inactivado, mientras que en la mayoría de los países europeos, se utilizan vacunas marcadoras (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006).

### **3. Interacción de virus con el citoesqueleto**

Los virus son parásitos celulares obligados que utilizan la maquinaria de la célula hospedadora durante su ciclo de vida. A continuación se ejemplifica la utilización de los sistemas activos de transporte de actina y microtúbulos de la célula durante el ciclo de replicación viral. Para ello se describe en primer lugar la composición y función del citoesqueleto de las células eucariotas y finalmente se ejemplifica la interacción de grupos diversos de virus con el citoesqueleto.

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una gran variedad de formas y llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados depende de una red compleja de filamentos proteicos que se extienden a través del citoplasma. Esta red recibe el nombre de citoesqueleto, aunque es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se divide y responde a su entorno.

Las actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada tipo de filamento está formado por una subunidad proteica distinta: actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas relacionadas, entre ellas las láminas, para los filamentos intermedios.

En cada uno de los tres principales tipos de proteínas del citoesqueleto, miles de moléculas proteicas se ensamblan formando un filamento lineal. Estos filamentos conectan complejos proteicos y organelas de distintas regiones de la célula y permiten el transporte entre ellos. Además, forman el soporte mecánico de las células, importante especialmente en las células animales que carecen de pared celular externa.

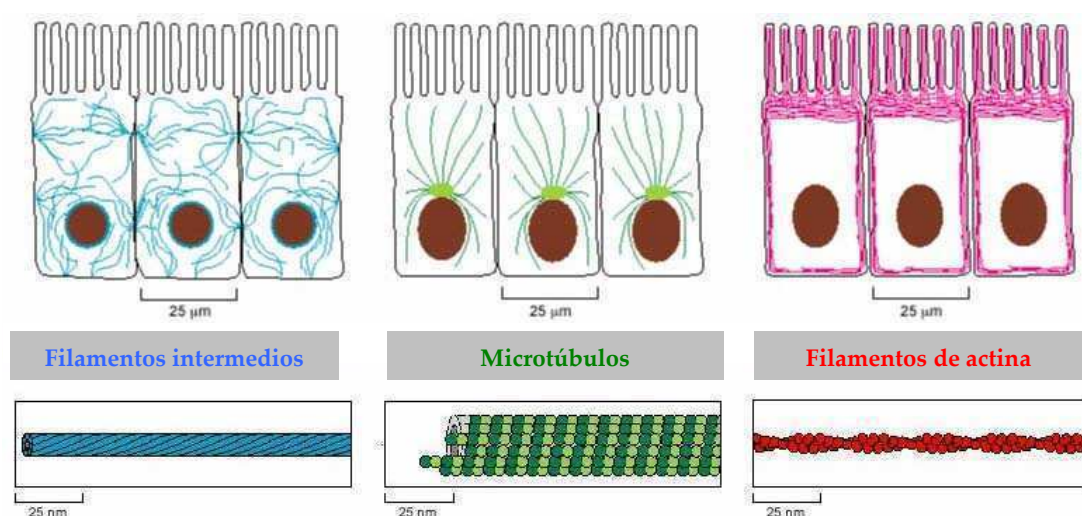
Tanto los filamentos de actina, como los microtúbulos y los filamentos intermedios son polímeros helicoidales con una posición y función diferente en la célula. Sin embargo, éstos por sí mismos no son responsables ni de la forma ni de la longitud de la célula. Sus funciones dependen de un gran número de proteínas accesorias que unen los filamentos entre sí o con otros componentes celulares. Estas proteínas accesorias son esenciales para el ensamblado de los filamentos proteicos y proporcionan los motores que mueven las organelas a lo largo de los filamentos, o mueven los filamentos unos respecto de otros.

Los filamentos intermedios son fibras proteicas resistentes y duraderas de un diámetro aproximado de 10 nm. Su principal función es soportar la tensión mecánica. En la mayoría de las células animales, una extensa red de filamentos intermedios rodea al núcleo y se extiende desde ésta zona hasta la periferia celular, donde interacciona con la membrana plasmática. Además, la lámina nuclear, un armazón densamente tejido de filamentos intermedios, se encuentra debajo de la envoltura del núcleo (Fig. 4).

Los microtúbulos están constituidos por moléculas de tubulina, cada una de las cuales es un heterodímero formado por dos subunidades globulares fuertemente unidas entre sí,

llamadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. La polimerización y despolimerización de los microtúbulos es compleja e interviene en procesos de gran importancia biológicas, como por ejemplo la división celular. En la mayoría de las células animales el centrosoma es el centro organizador de microtúbulos más importante.

Los filamentos de actina, también llamados microfilamentos, son polímeros helicoidales de la proteína actina. Aparecen como estructuras flexibles de 5 a 9 nm de diámetro que están organizadas en una gran variedad de haces, redes bidireccionales y geles tridimensionales. Aunque los filamentos de actina están dispersos por todo el citoplasma de la célula, están altamente concentrados en el cortex, por debajo de la membrana plasmática (Fig. 4).



**Figura 4:** Componentes del citoesqueleto. Se esquematizan cómo están formados a partir de sus subunidades y cómo se distribuyen en la célula los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina. Adaptado de Alberts *et al.*, 1996.

Al igual que los microtúbulos, los filamentos de actina son estructuras polares, con un extremo “menos”, relativamente inerte y de crecimiento lento, y un extremo “más”, de crecimiento rápido. El comportamiento dinámico de los filamentos de actina requiere la

hidrólisis de ATP. Esta hidrólisis debilita los enlaces del polímero favoreciendo la despolimerización.

Las drogas que estabilizan o desestabilizan los filamentos de actina constituyen herramientas importantes para investigar el comportamiento dinámico de éstos filamentos en las células. Las faloidinas son toxinas aisladas de hongos pertenecientes a la familia *Amanita*, éstas se unen muy fuertemente a los filamentos de actina y los estabilizan, impidiendo su despolimerización (Cooper, 1987).

En las células animales, los filamentos de actina corticales están organizados en tres tipos generales de disposiciones: i) en *haces paralelos*, como en las microespinas y en los filopodios, encontrándose los filamentos orientados con la misma polaridad y espaciados muy regularmente (10-20 nm); ii) en *haces contráctiles*, encontrados en las fibras de estrés y en el anillo contráctil que divide a la célula en dos durante la mitosis, en los cuales los filamentos se orientan con polaridades opuestas, mucho más espaciados (30-60 nm) y presentan la proteína motora miosina II y iii) en *redes parecidas a geles* del cortex celular, en las cuales los filamentos se encuentran en forma más relajada, en disposiciones abiertas con interconexiones ortogonales. Estas distintas disposiciones de los filamentos de actina se generan y se mantienen debido a la presencia de las proteínas de entrecruzamiento de los filamentos de actina (como la fimbrina, la  $\alpha$ -actinina y la filamina).

En las células eucariotas superiores se forman transitoriamente haces contráctiles organizados de filamentos de actina y miosina que cumplen una función específica y luego se deshacen. Un ejemplo son las fibras de estrés, componentes mayoritarios del citoesqueleto de los fibroblastos en cultivo. Las fibras de estrés se insertan por uno de sus extremos en la membrana plasmática, mediante unas uniones especiales llamadas contactos focales, lugar donde la cara externa de la célula está íntimamente unida a la matriz extracelular. Por el otro extremo se insertan en un segundo contacto focal o en una red de filamentos intermedios que rodea el núcleo celular. Las fibras de estrés se forman en respuesta a la tensión generada a través de la célula y se desensamblan cuando la célula se redondea y pierde sus uniones al sustrato.

La presencia de organelas y del citoesqueleto, en particular de los filamentos de actina, así como una alta concentración de proteínas, restringe la difusión libre de moléculas mayores de 500 KDa en el citoplasma. Por lo tanto, los virus deben utilizar los sistemas de transporte activo de actina y microtúbulos de la célula hospedadora. En la periferia celular, y probablemente en el núcleo, el transporte es mediado por el sistema de actina, ya sea por la polimerización de nuevos filamentos que actúan “empujando” las partículas, o por el movimiento a través de miosinas a lo largo de los filamentos de actina. Las proteínas motoras citoplasmáticas, dineina y kinesina, catalizan el transporte a lo largo de los microtúbulos, comunicando así la periferia con el centro de la célula.

A continuación se ejemplifican las interacciones de virus con el citoesqueleto en distintas etapas del ciclo de replicación viral:

#### **i. Unión de la partícula viral:**

La unión del virus a los receptores celulares puede inducir un cambio conformacional en los mismos, disparando la internalización del virus ya sea por endocitosis, fusión o penetración de la membrana plasmática.

El córtex de actina restringe la difusión de los viriones del virus del simio 40 (SV40) unidos a sus receptores, de forma tal que estos se mueven lateralmente y de forma aleatoria hasta que son atrapados en las caveolas (invaginaciones de la membrana plasmática revestidas por la proteína caveolina) (Pelkmans *et al.*, 2002). En este sentido, ha sido reportado que la despolimerización de la actina incrementa también el movimiento de las vesículas transportadoras recubiertas de clatrina (Gaidarov *et al.*, 1999), sugiriendo una función de andamiaje para el córtex de actina que orchestra tanto el movimiento de las caveolas como el de las vesículas recubiertas de clatrina.

**ii. Internalización de la partícula viral:**

Durante la penetración de las partículas virales a la célula también ocurren interacciones entre virus y citoesqueleto. Un ejemplo es el reclutamiento de fibras de actina hacia las caveolas conteniendo viriones de SV40. Este reclutamiento ocurre mediante la despolimerización de las fibras de estrés de actina debido a la fosforilación de residuos específicos de tirosina llevada a cabo por el mismo virus (Pelkmans *et al.*, 2002).

**iii. Replicación del genoma viral:**

Luego de la internalización, el virus alcanza el sitio de replicación genómica. Ha sido demostrado que diversos virus utilizan los microtúbulos y la proteína motora dineína para alcanzar el núcleo celular. El poliomavirus murino es transportado a lo largo de los microtúbulos como una carga citosólica luego de salir de la vesícula endocítica (Seisenberger *et al.*, 2001). Por otro lado, HSV y HIV que entran a la célula por fusión de su membrana con la membrana plasmática, requieren dineína para el transporte de las cápsides o de los complejos de preintegración (Dohner *et al.*, 2002, McDonald *et al.*, 2002, Petit *et al.*, 2003).

**iv. Ensamblado de la partícula viral:**

Después de la replicación del genoma y de la síntesis de proteínas, los componentes del virión son transportados al sitio de ensamblado del virus. En el caso del virus de influenza o de HIV, luego de la replicación en el núcleo las partículas subvirales conteniendo el genoma son exportadas a través de los poros nucleares, mientras que en los herpesvirus, adenovirus y baculovirus, el genoma es empaquetado dentro de la cápside en el núcleo celular (Dohner *and* Sodeik, 2004; Whittaker, 2003; Whittaker *and* Helenius, 1998). Un estudio reciente sugiere que las cápsides nucleares de HSV pueden ser activamente transportadas a la membrana nuclear por gemación primaria, un proceso que es abolido cuando se utilizan drogas que inducen la despolimerización de los filamentos de actina o inhiben la proteína motora miosina (Forest *et al.*, 2005).

**v. Egreso de las partículas virales:**

Finalmente, luego de haberse completado el ensamblado de la partícula viral, el virus es liberado de la célula ya sea por exocitosis, por gemación a partir de la membrana plasmática, o por lisis celular.

La salida por exocitosis o gemación requiere nuevamente atravesar el córtex de actina para llegar a la membrana plasmática. Como ocurre durante la entrada del virus a la célula, las membranas que contienen viriones formados pueden modificar el cortex de actina por mecanismos similares a los que operan en las vías secretorias y de exocitosis de la célula. El carácter dual del citoesqueleto de actina actuando a veces como barrera y otras veces facilitando el transporte, permite explicar por qué el uso de drogas despolimerizantes de actina incrementa la dispersión del virus de la anemia infecciosa equina (Chen *et al.*, 2004), mientras que pueden inhibir la gemación de HIV (Sasaki *et al.*, 1995).

La gemación del virus de influenza también se ve afectada por la acción de drogas despolimerizantes de actina, probablemente debido a que el córtex de actina mantiene la correcta estructura de los parches lipídicos (*lipid rafts*) que serán luego incorporados en la envoltura viral (Simpson-Holley *et al.*, 2002).

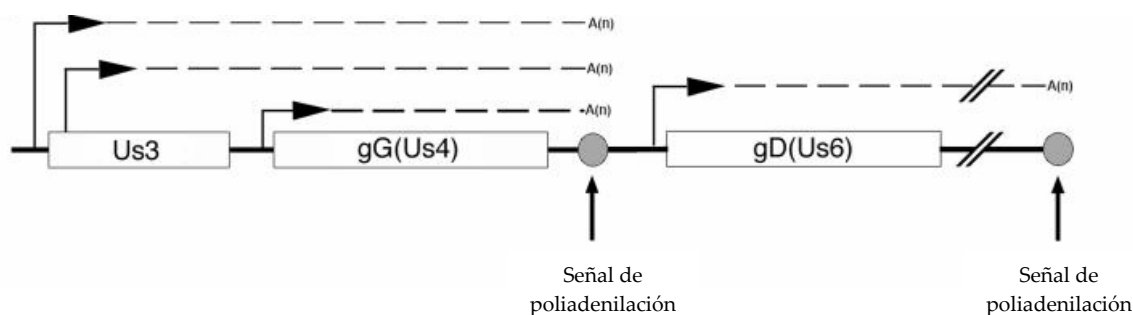
**4. La proteína Us3 de los alfaherpesvirus**

El *locus* del gen codificante para la proteína Us3 se encuentra en posiciones equivalentes dentro de la región US del genoma de los alfaherpesvirus, lo que indica que este gen fue adquirido por un progenitor común de los alfaherpesvirus actuales. Tal adquisición pudo haber sido directa, a partir de un genoma celular, o indirecta, mediada por retrovirus. La variabilidad presente entre proteínas Us3 de distintos alfaherpesvirus indica que ésta ha sufrido cambios importantes desde su incorporación al genoma de los herpesvirus. Por ello, es difícil encontrar proteínas celulares con secuencia similar a Us3, a diferencia de lo que

ocurre por ejemplo con los genes *onc* de los retrovirus, que aún tienen contrapartes cercanas en los genomas celulares (McGeoch *and* Davison, 1986).

Hasta el momento, la presencia del gen codificante para la proteína Us3 es característica de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, ya que no se encontró en miembros de otras subfamilias de herpesvirus. Más aún, ninguno de los genes codificados en la región US del genoma de los alfaherpesvirus presenta homólogos en el genoma de los gamaherpesvirus, a diferencia de lo que ocurre con los genes codificados por la región UL. Es por esto que se cree que la pérdida o ganancia de la región US, incluyendo el gen codificante para Us3, pudo haber sido un evento significativo en la evolución divergente de las subfamilias *alfa* y *gammaherpesvirinae* (McGeoch *and* Davison, 1986).

La regulación de la transcripción del gen *us3* ha sido estudiada para los virus PrV y HSV. En estos virus, los genes *us3* y *gG* (*us4*) se transcriben como una única unidad transcripcional, encontrándose la señal de poliadenilación río abajo del gen *gG*. (Leung-Tack *et al.*, 1994 ; Rea *et al.*, 1985; Rixon *et al.*, 1985) (Fig. 5). Además, ha sido reportada para estos virus la presencia de más de un ARN mensajero específico para Us3, codificante en ambos casos para dos isoformas de esta proteína (Fig. 5). Estas isoformas se denominan larga y corta en el caso de PrV y representan el 5% y el 95% de la proteína Us3, respectivamente. En el caso de HSV las isoformas se denominan Us3 y Us3.5.

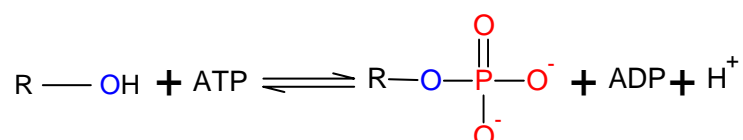


**Figura 5:** Esquema de la unidad transcripcional Us3/Us4 en PrV. Se indican los transcriptos esperados tras la infección de cultivos celulares con PrV. Adaptado de Demmin *et al.*, 2001.



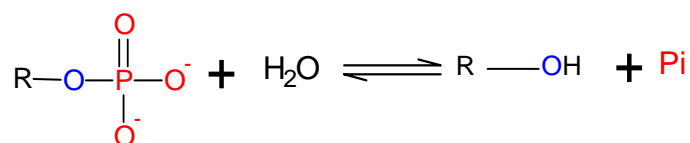
Estudios de caracterización bioquímica y funcional llevados a cabo principalmente con la proteína Us3 de HSV-1 y PrV, revelaron que ésta es una proteína quinasa (Frame *et al.*, 1987; Purves *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1990). Los herpesvirus codifican, además, otras dos proteínas quinasas en sus genomas, codificadas por los genes *UL13* y *UL39*, las cuales se encuentran presentes en las subfamilias *alfa*, *beta* y *gammaherpesvirinae*. A diferencia de lo que ocurre con *UL13* y *UL39*, y según lo mencionado anteriormente, la proteína Us3 es una proteína quinasa conservada presente únicamente en la subfamilia *alfaherpesvirinae*.

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas según la siguiente reacción:



La fosforilación es el tipo más común de modificación covalente reversible y permite regular la actividad de numerosas enzimas y proteínas diana. Una clase de proteínas quinasas transfiere el grupo fosforilo terminal ( $\gamma$ ) del ATP a residuos específicos de serina y de treonina de la proteína diana y otra clase lo transfiere a los residuos de tirosina. Los aceptores del grupo fosforilo en las reacciones de fosforilación de proteínas están localizados dentro de las células, donde el ATP es abundante. Las proteínas extracelulares no son reguladas por fosforilación reversible.

Las proteínas fosfatasas revierten el efecto de las quinasas catalizando la hidrólisis de los grupos fosforilo unidos a las proteínas. La cadena lateral que contenía un grupo hidroxilo no modificado se regenera y se produce ortofosfato (Pi).



Algunas proteínas quinasas fosforilan una única proteína diana, mientras que las proteínas quinasas multifuncionales modifican covalentemente a diversos sustratos. Las señales bioquímicas pueden ser muy amplificadas mediante cascadas de fosforilación, debido a que una sola quinasa puede actuar sobre muchas moléculas diana.

Por ser una proteína quinasa característica de los alfa herpesvirus y presentar la potencial capacidad de modificar la actividad de proteínas tanto virales como celulares regulando así el ciclo de replicación viral, numerosas investigaciones están siendo llevadas a cabo con la proteína Us3 de diversos alfa herpesvirus, en particular de HSV-1 y PrV. En base a estos estudios se determinó, además, que la proteína quinasa Us3 se encuentra implicada en el fenómeno de apoptosis, en el egreso de las cápsides virales del núcleo celular y en el desensamblado del citoesqueleto. Todos estos aspectos constituyen temas de relevancia actual en la biología de los herpesvirus y serán desarrollados a continuación.

En cuanto a su rol como proteína quinasa, trabajos realizados en HSV demostraron que Us3 reconoce la misma secuencia de fosforilación que la proteína quinasa A (PKA), fosforila sustratos de PKA e inclusive, es capaz de fosforilar la subunidad reguladora de PKA (Benetti *and* Roizman, 2004). Entre los sustratos conocidos directamente fosforilados por Us3, se encuentran las proteínas virales UL34, ICP22, Us9 y UL31 así como la proteína celular Bad (Kato *et al.*, 2005).

La actividad de las proteínas quinasas celulares se encuentra altamente regulada: en la célula estas proteínas se activan o inactivan por fosforilación, por la unión de subunidades reguladoras o dependiendo de su localización subcelular en un momento determinado (Roux *and* Blenis, 2004). En este aspecto, se identificó recientemente un sitio fisiológico de autofosforilación en la proteína Us3 de HSV-1, la serina 147 (Kato *et al.*, 2008). La sustitución de esta serina por alanina (S147A) atenúa la actividad de quinasa de la proteína Us3 *in vitro* y modifica algunas de sus funciones durante la infección viral. Estos autores también observaron que, *in vitro*, PKA es capaz de fosforilar a Us3 en la serina 147. Este aminoácido de la proteína Us3 se encuentra conservado entre distintas cepas de HSV-1, pero no está presente

en la proteína Us3 de otros alfa herpesvirus como HSV-2 y PrV, sugiriendo que este sitio de regulación sería específico para HSV-1 (Kato *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado un fuerte rol antiapoptótico para la proteína Us3 de HSV y de PrV, el cual se pone de manifiesto en distintos aspectos del ciclo de replicación viral. La proteína Us3 de HSV contrarresta la apoptosis inducida por: i) la infección viral, ya sea con cepas *wild type* (wt) o con mutantes de replicación incompetentes (Leopardi *et al.*, 1997); ii) la sobre expresión de miembros de la familia bcl-2 (Benetti *et al.*, 2003; Cartier *et al.*, 2003a; Cartier *et al.*, 2004; Ogg *et al.*, 2004); iii) las células T CD8<sup>+</sup> (Cartier *et al.*, 2003b); o, iv) por varios inductores exógenos como el *shock* osmótico, la radiación ultravioleta, el sorbitol y la estaurosporina (Geenen *et al.*, 2005 Murata *et al.*, 2002). En contraposición con estos trabajos, no se le ha podido atribuir un rol anti-apoptótico a la proteína Us3 de BoHV-1 (Takashima *et al.*, 1999).

En cuanto a la apoptosis inducida por la infección viral, ensayos de TUNEL y microscopía electrónica de ganglio trigémino de ratones infectados con una cepa salvaje de HSV-2 y una cepa recombinante que no expresa la proteína Us3, sugieren que la proteína Us3 tiene un rol importante en la protección de estas neuronas frente a la apoptosis (Asano *et al.*, 2000).

Como se mencionó previamente, existen varios estudios que confirman que la proteína Us3 de HSV y de PrV es capaz de bloquear la apoptosis inducida por la sobre expresión de Bad, Bid y Bax, proteínas pertenecientes a la familia bcl-2 (Ogg *et al.*, 2004). Los miembros de esta familia de proteínas se caracterizan por tener actividad pro o anti apoptótica. Los miembros pro apoptóticos, como Bax, Bid y Bad, inician la apoptosis por liberación de citocromo c desde la mitocondria. Los factores anti apoptóticos, como bcl-2, antagonizan la actividad de los factores pro apoptóticos por unión a los mismos, inactivándolos (Antonsson, 2001; Scorrano and Korsmeyer, 2003). Ha sido demostrado que la fosforilación de Bad no sería esencial para que la proteína Us3 ejerza su rol antiapoptótico (Benetti *et al.*, 2003). La actividad antiapoptótica de Us3 correlaciona con la inhibición proteolítica de Bad, sugiriendo que esta proteína podría actuar río arriba de Bad, a nivel de las caspasas.

Respecto a los inductores exógenos, ha sido reportado que altas concentraciones de sorbitol inducen apoptosis por alteración de la membrana plasmática, secuestrando receptores de la superficie celular y activando la cascada de transducción de señales (Rosette *and* Karin 1996). Asimismo, la estaurosporina, un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), induce apoptosis dependiente de caspasa-3 por vía mitocondrial (Jacobsen *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2000). La infección de células ST (*swine testicle*) con PrV genera resistencia a la apoptosis inducida por sorbitol y estaurosporina siendo la expresión de Us3 indispensable para tal efecto (Geenen *et al.*, 2005). Además, ha sido demostrado que una mutación puntual en el putativo sitio de unión a ATP de la proteína Us3 de PrV inhibe su actividad protectora frente a la apoptosis inducida por estaurosporina, poniendo de manifiesto el requerimiento de la actividad de quinasa de Us3 para este fenómeno (Deruelle *et al.*, 2007).

Para analizar el rol de la proteína Us3 en el egreso de las cápsides virales del núcleo celular es necesario resaltar ciertos aspectos de la morfogénesis de los herpesvirus. Como se mencionó previamente, el genoma viral replica y se empaqueta en cápsides preformadas en el núcleo celular. Luego, las nucleocápsides son traslocadas al citoplasma por un proceso que pareciera implicar la envoltura y desenvoltura secuencial de las mismas. Las cápsides intranucleares obtienen su envoltura y tegumento primario al gemar de la cara interna de la membrana nuclear. Al fusionarse luego con la cara externa de la membrana del núcleo, las nucleocápsides son liberadas al citoplasma. La envoltura final, así como las proteínas del tegumento, son obtenidas por gemación con las vesículas del *trans* Golgi y posterior fusión con la membrana plasmática (Mettenleiter, 2002).

Ha sido demostrado que las proteínas UL31 y UL34 de PrV y HSV-1 juegan un rol importante en la formación de los viriones primarios (Chang *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2002; Klupp *et al.*, 2000; Muranyi *et al.*, 2002; Roller *et al.*, 2000). En ausencia de las mismas, la obtención de envoltura primaria en la cara interna de la membrana nuclear se encuentra bloqueada y las nucleocápsides se acumulan en el núcleo. Asimismo, se ha observado que la proteína Us3 de PrV juega un rol importante en la fusión de los viriones que poseen envoltura primaria con la cara externa de la membrana del núcleo. En ausencia de Us3 estos viriones se acumulan en el espacio perinuclear (Klupp *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002). Sin

embargo, durante este proceso, el estado de fosforilación de UL34 permanecería inalterado tanto en presencia como en ausencia de la proteína Us3 (Klupp *et al.*, 2001). Esto llevó a sugerir que la actividad de proteína quinasa de Us3 no sería relevante para la morfogénesis viral, sino que esta proteína estaría cumpliendo un rol principalmente estructural en este proceso (Granzow *et al.*, 2004).

Estudios realizados en los últimos años han revelado que la proteína Us3 de HSV y PrV se encuentra involucrada en el desensamblado del citoesqueleto (Murata *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2005; Van Minnerbruggen *et al.*, 2002). Para completar su ciclo de replicación, los virus utilizan la maquinaria celular del hospedador. Se ha sugerido que el desensamblado del citoesqueleto podría favorecer tanto la replicación como la dispersión viral (Favoreel *et al.*, 2005). La infección de líneas celulares con HSV-1 y EHV-1 lleva a un desensamblado de los microtúbulos (Avitabile *et al.*, 1995; Walter and Nowotny, 1999), mientras que la infección con PrV induce el desensamblado de los filamentos de actina pero no altera los microtúbulos (Van Minnerbruggen *et al.*, 2002). Además, se determinó que la proteína Us3 de PrV se encuentra involucrada en este proceso (Van Minnerbruggen *et al.*, 2003). Us3 no produce disminución en los niveles de expresión de actina y sólo causa el desensamblado de las fibras de estrés cuando se encuentra en el núcleo (Van Minnerbruggen *et al.*, 2003). Asimismo, la proteína Us3 de PrV se encuentra involucrada en la formación de proyecciones celulares de actina y tubulina (Calton *et al.*, 2004; Favoreel *et al.*, 2005) a través de las cuales las partículas virales se diseminan hacia otras células evadiendo de este modo la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Favoreel *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios realizados con la proteína Us3 de HSV-2 demostraron que esta proteína también induce el redondeamiento celular y el desensamblado de las fibras de estrés (Murata *et al.*, 2000).

La actividad de quinasa de la proteína Us3 de PrV es necesaria para la reorganización del citoesqueleto de actina (Van den Broeke *et al.*, 2009a). Mediante ensayos de infección y de transfección transitoria, estos autores demostraron que mutaciones en el sitio activo de quinasa de la proteína Us3 de PrV inhiben la formación de proyecciones celulares así como el desensamblado de las fibras de estrés. Por otra parte, el rol de la proteína Us3 en el

desensamblado del citoesqueleto ha sido también estudiado en el virus de la enfermedad de Marek (MDV) (Schumacher *et al.*, 2005). Estos autores determinaron que la proteína Us3 se encuentra involucrada en el desensamblado de las fibras de estrés de actina, sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con PrV, este efecto es temporal y las fibras de estrés se reorganizan entre las 24 y 48 horas. Estudios más recientes revelaron que la actividad de quinasa de la proteína Us3 de MDV no es necesaria para inducir la reorganización de actina (Schumacher *et al.*, 2008). Ensayos de transfección realizados con la proteína Us3 de MDV mutada en su sitio activo de quinasa resultan en el desensamblado de las fibras de estrés de actina (Schumacher *et al.*, 2008). En conjunto, el desensamblado transitorio del citoesqueleto de actina y la falta de requerimiento de la actividad de quinasa de la proteína Us3 de MDV para llevar a cabo esta función, indicarían que esta proteína difiere de las estudiadas en otros alfa herpesvirus. Por otra parte, la inducción de proyecciones celulares de actina no ha sido reportada para la proteína Us3 de MDV, lo cual, sumado a lo mencionado previamente, podría sugerir que la actividad catalítica de la proteína Us3 de PrV podría ser más robusta que la actividad no catalítica de la proteína Us3 de MDV.

Los cambios morfológicos observados en células transfectadas con plásmidos codificantes para las proteínas Us3 de HSV-2 o de PrV resultan similares a los efectos observados al inhibir las proteínas celulares pertenecientes a la familia de proteínas Rho (Murata *et al.*, 2000). Esta familia de proteínas está formada por pequeñas GTPasas relacionadas involucradas en el control de la reorganización de la actina y de la división citoplasmática. En base a estas observaciones fue posible avanzar en el entendimiento sobre el mecanismo mediante el cual la proteína Us3 ejerce sus efectos sobre el citoesqueleto. Además, estos autores demostraron que la proteína Us3 de HSV-2 afecta la vía de señalización Cdc42/Rac, importante en la regulación del ensamblado y desensamblado de las fibras de estrés (Murata *et al.*, 2000).

El mecanismo de acción de la proteína Us3 de PrV ha sido recientemente dilucidado (Van den Broeke *et al.*, 2009b). Estos autores encontraron que el grupo A de proteínas quinasas activadas por p21 (PAK) se encuentra involucrado en los cambios en el

citoesqueleto de actina mediados por Us3, y que Us3 puede unirse y fosforilar PAK 1 y PAK 2. Además, observaron que PAK 2 resulta crucial para el desensamblado de las fibras de estrés de actina mediado por Us3, mientras que PAK 1 es relevante principalmente en la formación de proyecciones inducidas por Us3.

Virus pertenecientes a otras familias, como el virus de la inmunodeficiencia humana, HIV (*retroviridae*) y el Virus Vaccinia, VV (*poxviridae*), también provocan el desensamblado de las fibras de estrés de actina y la formación de proyecciones celulares que contienen actina (Fackler *et al.*, 1999; Fackler and Krausslich, 2006; Greber and Way, 2006; Valderrama *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de estos virus, las proteínas virales involucradas, Nef (HIV) y F11L (VV), no presentan actividad de quinasa. La proteína Nef induce la reorganización de actina por unión y activación indirecta de PAKs del grupo A, via las GTPasas Rho Cdc42 y Rac1 (Fackler *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1996; Renkema *et al.*, 1999). En tanto que para VV, la proteína F11L induce rearrreglos en el citoesqueleto por interacción e inactivación de la proteína RhoA (Valderrama *et al.*, 2006).

El modo de acción de la proteína Us3 de PrV mostró, por primera vez, un mecanismo catalítico de desensamblado de las fibras de estrés y formación de proyecciones inducidas por virus (Van den Broeke *et al.*, 2009b). Siendo que diferentes virus han desarrollado diferentes mecanismos para inducir rearrreglos de actina, estos rearrreglos tendrían gran importancia en el ciclo de vida de los virus.

La identificación de proteínas celulares y virales involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto de actina, y por ende, en la dispersión y egreso de las partículas virales durante la infección, abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias antivirales.

# Hipótesis



## Hipótesis

1. Las propiedades replicativas *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5 son similares a las de otras cepas de BoHV-5.
2. La proteína Us3 de BoHV-5 induce modificaciones sobre el citoesqueleto de actina, siendo su dominio predicho de proteína quinasa esencial para estos efectos.

# Objetivos

**Objetivo general**

Contribuir a la caracterización de la cepa argentina A663 de BoHV-5 a través del estudio de sus propiedades replicativas *in vitro* y de la función de la proteína Us3.

**Objetivos particulares**

1. Estudiar la replicación *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5.
2. Secuenciar el gen codificante para la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5.
3. Evaluar la cinética de expresión de la proteína Us3 durante la infección *in vitro* con BoHV-5.
4. Estudiar las modificaciones del citoesqueleto inducidas por la proteína Us3 de BoHV-5.
5. Estudiar la relevancia de la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 en las modificaciones del citoesqueleto inducidas por esta proteína.

# **Materiales y Métodos**

## 1. Virus y células

En este trabajo se utilizaron las cepas A663 (aislamiento argentino de campo) (Schudel et al., 1986) y N569 (aislamiento australiano de campo) (French et al., 1962) de BoHV-5. Ésta última fue provista por el Dr. Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liege, Bélgica.

Ambas cepas virales fueron propagadas en la línea celular de riñón bovino Mardin Darby (MDBK) a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Como medio de mantenimiento se utilizó medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-E, Gibco), suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y antibiótico/antimicótico [100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, (Gibco)].

Los ensayos de transfección transitoria fueron realizados en las líneas celulares BHK-21 (riñón de hámster) y VERO (riñón de mono verde) a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Como medio de mantenimiento se utilizó MEM-D (medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco) para la línea BHK-21 y una relación 50:50 MEM-E:MEM-D para la línea celular VERO.

Las líneas de cultivo celular fueron provistas por la sección de Cultivos de Tejidos de Instituto de Virología, INTA Castelar.

## 2. Titulación viral

La cuantificación de virus infectivo se realizó por titulación a punto final. Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 de las muestras a titular en medio MEM-E (comenzando por la dilución 1:10) y luego se inocularon por cuádruplicado sobre monocapas de células MDBK crecidas en placas de 96 pocillos. Se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se reemplazó el inóculo viral por medio MEM-E 2% SFB. Las células fueron observadas al microscopio óptico luego de 48-72 horas para analizar la presencia de efecto citopático (ECP). El título viral fue calculado por el método de Reed y Muench (Reed *and* Muench, 1938).

### 3. Purificación de virus

Monocapas de células MDBK fueron crecidas en botellas de cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> de superficie (T150) e infectadas con las cepas A663 y N569 de BoHV-5 a multiplicidad de infección (MOI) 1. Cuando el ECP fue extensivo, las botellas fueron congeladas a -70°C. Luego de dos rondas sucesivas de congelado (-70°C) y descongelado (a temperatura ambiente), se realizó el clarificado a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C y el *pellet* obtenido fue resuspendido en 1 ml de *buffer* TE (Tris 200 mM pH8, EDTA 20 mM) NP-40 0,1 % v/v e incubado a 56°C por 1 hora. Luego se llevó a 30 ml con TE, se agregaron 5 ml de sacarosa 30% p/v en el fondo del tubo y se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 2 horas a 4°C. Se volcó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 500 µl de *buffer* de extracción (TE pH 8, SDS 1%, proteinasa K 0,5 mg/ml). Para lograr la disolución del *pellet*, se incubó a 56°C por 2 horas. Las muestras se conservaron a -20°C hasta realizar la extracción de ADN (sección 7.1).

### 4. Caracterización *in vitro* de las cepas A663 y N569 de BoHV-5

#### 4.1. Obtención de un *stock* viral de número de pasaje conocido

La obtención de un *stock* viral de BoHV-5 cepa N569 de número de pasaje conocido se realizó por pasajes sucesivos en monocapas de células MDBK. Se utilizó como inóculo viral inicial una secreción nasal de un bovino inoculado con BoHV-5 cepa N569 que presentó excreción viral (pasaje cero). Las monocapas de células MDBK infectadas fueron incubadas a 37°C por 24 horas o hasta observarse ECP extensivo. Luego fueron sometidas a tres rondas sucesivas de congelado (-70°C) y descongelado. Finalmente se clarificó el virus por centrifugación a 3.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -70°C hasta su utilización como inóculo viral para la obtención del pasaje siguiente. Este procedimiento se repitió hasta obtener un *stock* viral de número de pasaje 8.

Al inicio de esta tesis se contaba con un *stock* viral pasaje 5 de BoHV-5 cepa A663, a partir del cual se obtuvo el pasaje 8, según se describió para la cepa N569.

#### 4.2. Cinética de replicación viral

Monocapas de células MDBK crecidas en placas de 60 mm de diámetro (p60) fueron infectadas, en ensayos independientes, con BoHV-5 cepas A663 y N569 a MOI 0,1 y 5 (cinética de múltiples pasos y de un único paso, respectivamente). Se utilizó en primera instancia un stock viral de la cepa N569 de número de pasaje desconocido, pero luego se repitió el ensayo utilizando un stock viral pasaje 8 (sección 4.1). Para la cepa A663 se trabajó con un stock viral pasaje 8. Luego de la infección, las placas fueron incubadas 2 horas a 4°C para sincronizar la adsorción y posteriormente, 2 horas a 37°C. Luego, fueron tratadas con solución ácida (ácido cítrico 40mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM) durante 2 minutos, con el fin de inactivar las partículas virales que no hubieran penetrado en las células, y lavadas con *buffer* fosfato salino 1X (PBS 1X). Finalmente, se agregó medio MEM-E SFB 2% y las placas fueron incubadas a 37°C durante distintos tiempos. Los tiempos ensayados fueron: 0; 3; 6; 12; 24; 36 y 48 horas post infección (hpi) para la MOI 0,1 y 0; 3; 6; 12; 15; 18 y 24 hpi para la MOI 5. Para cada uno de los tiempos se obtuvieron, separadamente, las fracciones total, intra y extra celular. Para obtener la fracción total se colectaron juntos el sobrenadante de cultivo y las células. La fracción extracelular se obtuvo por centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos del sobrenadante de cultivo de las células infectadas, mientras que las células que quedaron adheridas en la placa fueron cosechadas en 1 ml de medio MEM-E SFB 2% y constituyeron la fracción intracelular. Estas fracciones fueron tituladas en células MDBK según lo detallado anteriormente. Cada tiempo se realizó por duplicado y cada fracción fue titulada dos veces.

#### 4.3. Ensayo de tamaño de placa de lisis

Monocapas de células MDBK fueron crecidas en placas de 12 pocillos e infectadas con diluciones seriadas en base 10 de las cepas virales A663 y N569 de BoHV-5. Luego de 2 horas de incubación a 37°C el inóculo viral fue removido y se agregaron 2 ml de carboximetil celulosa (CMC) SFB 1,5% (CMC 7,5 g/L, MEM-D 2X 480 ml/L, SFB 20 ml/L) por pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas. Luego, las placas de lisis generadas por la infección fueron fijadas y teñidas con cristal violeta, según se describe a continuación (4.3.1). Finalmente 100 placas de lisis aisladas y elegidas al azar fueron fotografiadas y el cálculo de

sus superficies fue realizado con el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). El análisis estadístico de los datos se realizó con el *test Rank Sum (Mann-Whitney)*.

#### **4.3.1. Tinción de las placas de lisis con cristal violeta**

A las 72 hpi se extrajo el medio semisólido de la placa de 12 pocillos por volcado, se agregó 1 ml de formol 10% (formol 10% preparado en PBS) por pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descartó el formol y se incubó durante 20 minutos con 1 ml de solución de cristal violeta por pocillo (cristal violeta 1%, etanol 10% en PBS, filtrado). Se retiró el colorante y se lavó bajo agua de canilla. Se dejó secar sobre papel durante 24 horas y se fotografiaron las placas de lisis bajo un microscopio óptico.

#### **4.4. Ensayo de tamaño de placa de infección**

La infección se realizó según lo descrito en la sección 3.3. A las 72 hpi, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% (2 g PFA en 50 ml de PBS 1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X y las células fueron incubadas con un anticuerpo específico contra BoHV conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (VMRD, Inc.) durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X y las placas de infección fueron fotografiadas con una cámara digital (Olympus C-7070) acoplada a un microscopio de fluorescencia. El área de las placas de infección fue calculada con el programa *ImageJ*. El análisis estadístico de los datos se realizó con el *test Rank Sum (Mann-Whitney)*.

### **5. Plásmidos**

El clonado de los productos de amplificación por PCR se realizó en el vector de clonado pGEM-T *easy* (Promega).

Para la expresión de proteínas en el sistema procariota se utilizó el plásmido de expresión bacteriana pRSET-A (Invitrogen), que permite la expresión de proteínas con un tracto de histidinas fusionado en su extremo amino terminal.



Para la expresión de proteínas en células eucariotas se utilizó el plásmido pECFP-N1 (Clontech). Este plásmido permite la expresión de la proteína de interés fusionada en su extremo carboxilo terminal a la proteína ECFP (*enhance cyan flourescent protein*).

Además se utilizó el plásmido no comercial de expresión eucariota pTrip, codificante para la proteína GFP (*green fluoresent protein*). Este plásmido fue cedido por el Dr. Favoreel del Departamento de Virología, Parasitología e inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Ghent, Bélgica.

Los esquemas e información relevante de los plásmidos utilizados se detallan en el Anexo I (Plásmidos).

## 6. Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron las cepas bacterianas de clonado *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  y TOP 10 F' y la cepa de expresión *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3 pLysS) (Novagen). Todas las cepas fueron crecidas en medio de cultivo LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L) a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Para el crecimiento en un medio semisólido se utilizó LB-agar (LB suplementado con agar 15 g/L).

Se utilizaron los antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/ml), cloranfenicol (20  $\mu$ g/ml) y kanamicina (10  $\mu$ g/ml) según correspondiera. Para identificar bacterias lacZ<sup>+</sup> se agregó al medio semisólido 20  $\mu$ g/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), de forma que las colonias lacZ<sup>+</sup> presentaran coloración azul. Para la inducción de la expresión de proteínas se empleó IPTG (isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido) a una concentración de 0,1 mM final.

Para la conservación de las bacterias, un volumen de cultivo bacteriano en fase estacionaria se mezcló con 0,5 volúmenes de glicerol 70% y se almacenó a -70°C.

## 7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para las distintas reacciones de amplificación por PCR realizadas se detallan en la siguiente tabla. La temperatura de fusión de los mismos fue estimada utilizando la siguiente fórmula,

$$Tf = 4^{\circ}\text{C} \times n^{\circ} (G+C) + 2^{\circ}\text{C} \times n^{\circ} (A+T)$$

donde n° representa el número de nucleótidos.

Oligonucleótido	Amplicón	Secuencia del oligonucleótido	Tf	Tamaño
Us3-F <sup>(a)</sup>	Us3	5' ATGGAGCGCGCGGCGGAG 3'	64°C	1335/1377 pb <sup>1</sup>
Us3-R <sup>(a)</sup>		5' TACCCCAAGGCCGCGCTGA 3'.	64°C	
Us3F1-F <sup>(b)</sup>	Us3F1	5' <u>GGATCC</u> GAGCCGAGCGGAGAGC 3'	76°C	338 pb
Us3F1-R <sup>(b)</sup>		5' <u>AAGCTT</u> TTACGCGCGTCCTCGGC 3'	78°C	
Us3F2-F <sup>(c)</sup>	Us3F2	5' <u>GGATCC</u> GAGAACGTCTTCCTCAAC 3'	74°C	353 pb
Us3F2-R <sup>(c)</sup>		5' <u>AAGCTT</u> TTAGTCGGTGGGGCTAGG 3'	74°C	
EcoRI-Us3f-F <sup>(d)</sup>	Us3f	5' <u>AGAATTC</u> ATGGAGCGCGCGGCGGAG 3'	82°C	1348 pb
BamHI-Us3f-R <sup>(d)</sup>		5' <u>GGATCC</u> AACCCCAAGGCCGCGCTG 3'	82°C	
EcoRI-Us3f-F <sup>(e)</sup>	Us3Nm	5' <u>AGAATTC</u> ATGGAGCGCGCGGCGGAG 3'	82°C	789 pb
Sall-Us3m-R <sup>(e)</sup>		5' <u>GTCGAC</u> GTCCCGATGGGC 3'	62°C	
Sall-Us3m-F <sup>(f)</sup>	Us3Cm	5' <u>GTCGAC</u> ACGGAGAACGTC 3'	58°C	563 pb
BamHI-Us3f-R <sup>(f)</sup>		5' <u>GGATCC</u> AACCCCAAGGCCGCGCTG 3'	82°C	
GAPDH-F	GAPDH	5' GCATCGTGGAGGGACTTATGA 3'	64°C	250 pb
GAPDH-R		5' GGGCCATCCACAGTCTTCTG 3'	64°C	
gG-F <sup>(g)</sup>	gG	5' ATGCCCCGCCCGCTCAA 3'	62°C	1323 pb
gG-R <sup>(g)</sup>		5' CTAGACGCGGAGCATGGGC 3'	64°C	

<sup>(a)</sup> y <sup>(g)</sup> Diseñados en base a la secuencia de la cepa SV507/99 de BoHV-5 (GenBank acceso n° AY261359).

<sup>1</sup>Tamaño del producto de PCR correspondiente a la cepa A663 y N569, respectivamente.

<sup>(b)</sup> Amplifican un fragmento interno comprendido entre los nucleótidos 79 y 417 de la secuencia codificante para la proteína Us3, que corresponde a las posiciones aminoacídicas 27-139.

<sup>(c)</sup> Amplifican un fragmento interno comprendido entre los nucleótidos 787 y 1140 de la secuencia codificante para la proteína Us3, que corresponde a las posiciones aminoacídicas 263-380.

<sup>(b)</sup> y <sup>(c)</sup> Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y HindIII (subrayados) en los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente permiten el clonado direccionado de los fragmentos Us3F1 y Us3F2.

<sup>(d)</sup> Amplifican el gen codificante para Us3 y permiten su clonado direccionado en el plásmido de expresión eucariota pECFP-N1, río arriba y en marco de lectura continuo con la secuencia nucleotídica codificante para ECFP. Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (subrayados) en los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente permiten el clonado direccionado de Us3f en pECFP-N1.

<sup>(e)</sup> Amplifican el fragmento Us3Nm comprendido entre los nucleótidos 1 y 783 de la secuencia codificante para la proteína Us3, que corresponde a las posiciones aminoacídicas 1-261 (región N-terminal de la proteína Us3). Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y Sall presentes en los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente permiten el clonado diseccionado de Us3Nm en el plásmido de expresión eucariota pECFP-N1. Además, el oligonucleótido Sall-Us3m-R genera una mutación puntual por sustitución del codón AAG presente en la secuencia nucleotídica codificante para Us3, por el codón GAC presente en el oligonucleótido. Esta sustitución se traduce en el cambio del aminoácido lisina (K) en la posición 261 de la proteína Us3 por el aminoácido ácido aspártico (D).

<sup>(f)</sup> Amplifican el fragmento Us3Cm comprendido entre los nucleótidos 781 y 1332 de la secuencia codificante para la proteína Us3, que corresponde a las posiciones aminoacídicas 261-444 (región C-terminal de la proteína Us3). Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall y BamHI presentes en los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente permiten el clonado diseccionado de Us3Cm en el plásmido de expresión eucariota pECFP-N1. El oligonucleótido Sall-Us3m-F genera la misma mutación puntual que el oligonucleótido Sall-Us3m-R.

<sup>(g)</sup> Amplifican el gen codificante para la glicoproteína G (gG) de BoHV-5.

## **8. Extracción de ácidos nucleicos**

### **8.1. Extracción de ADN a partir de virus purificado**

Para la extracción de ADN viral a partir de virus purificado, se agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (24:25:1), se mezcló por inversión, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. La misma fue nuevamente tratada con fenol: cloroformo: isoamílico, mezclada y centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego se agregaron 1/10 de volumen de acetato de sodio (AcNa) 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó 1 hora a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado 2 veces con 600 µl de etanol

70%. Luego el *pellet* fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 µl de agua deionizada por 16 horas a 4°C. Finalmente se corroboró la integridad del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (sección 9.3.1.) y se cuantificó la muestra por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV Nanodrop ND-1000.

## **8.2. Extracción de ARN a partir de células eucariotas**

Se realizó la extracción de ARN a partir de células MDBK infectadas con BoHV-5 a MOI 0,5. Los tiempos ensayados fueron: 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 20 y 24 hpi. Se utilizó el *kit* comercial *Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II*, según las indicaciones del fabricante (Clontech).

## **9. Metodología del ADN recombinante**

Las técnicas de ADN recombinante se realizaron de acuerdo con los métodos estándares (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1994).

### **9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl. Se utilizaron 5 ng de ADN viral o 40 ng de ADN plasmídico, según correspondiera, *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa *Green Go Taq 5X* (Promega), dNTPs 200 µM (cada uno), 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Debido al alto contenido de GC del genoma de los herpesvirus (72 % en BoHV-5) fue necesario, en todos los casos, utilizar un programa de ciclado del tipo *touch-down*. Los programas utilizados se detallan en el Anexo I I (Condiciones de reacción y ciclado de PCR).

### **9.2. Retrotranscripción-PCR (RT-PCR)**

Para la reacción de transcripción reversa (RT), 0,3 µg de oligodT15 (0,5 µg/µl) fueron incubados con 7 µl de ARN extraído en cada uno de los tiempos de infección ensayados (sección 8.2.) a 70°C por 10 minutos. Luego se agregó el *buffer* 5X de la enzima M-MLVRT,

dNTPs (5mM de cada uno), 40 unidades (U) de RNA sin y 200 U de M-MLVRT (Promega). El volumen final de la reacción se llevó a 25 µl con H<sub>2</sub>O libre de ARNsas, se incubó 1 hora a 42°C y luego 15 minutos a 70°C. El ADN copia (ADNc) obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

A partir del ADNc obtenido para cada uno de los tiempos ensayados, se amplificó por PCR un fragmento interno del gen codificante para la enzima gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (gen *gapdh*), gen celular de expresión constitutiva (control de extracción de ARN y RT), y un fragmento interno de 336 pb del gen *us3* (Us3F1). Para la amplificación del gen *gapdh* se utilizó 1 µl del ADNc obtenido, *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa *Green Go Taq* 5X (Promega), dNTPs 200 µM, 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido (GAPDH-F y GAPDH-R) y 1 unidad de enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El programa de ciclado se detalla a continuación:

Amplificación del gen <i>gapdh</i>		
Templado	Ciclado	
ADN copia	Desnaturalización inicial: 95°C 5 min.	
<b>Oligonucleótidos</b>  GAPDH-F  GAPDH-R	30 ciclos	Desnaturalización: 95°C, 1 min Hibridación: 53°C, 1 min Elongación: 72°C, 1 min
<b>Pares de bases amplificadas</b>  250	Elongación final: 72°C 10 min	

Para la amplificación específica del fragmento interno del gen *us3* se utilizaron los oligonucleótidos Us3F1-F y Us3F1-R y se llevó a cabo la reacción de amplificación por PCR según se detalla en el Anexo II (Amplificación del fragmento Us3F1).

Además, se incluyeron controles de reacciones de amplificación por PCR directas sobre el ARN total purificado (sin el paso de RT) para eliminar la posibilidad de amplificación a partir de ADN genómico viral.

### 9.3. Electroforesis para muestras de ácidos nucleicos

#### 9.3.1. Electroforesis en geles de agarosa nativos

Las muestras de ADN y ARN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 % y 1,5 % en *buffer* TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm<sup>2</sup>. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml de gel y un transiluminador de luz UV. Las muestras se sembraron con *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 5X, azul de bromo-fenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando el equipo Fotodyne y el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

#### 9.3.2 Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes

Las muestras de ARN se resolvieron en geles de agarosa 1,2 % con formaldehído. Se fundió la agarosa en un volumen adecuado de H<sub>2</sub>O deionizada y se dejó enfriar hasta 55-60°C. Se agregaron formaldehído y *buffer* MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM, pH 7) hasta una concentración final de 6% y 1X respectivamente. Las muestras a sembrar se resuspendieron en 50% de formamida, conteniendo 6% de formaldehído y *buffer* MOPS 1X. Se calentaron a 55°C durante 10-15 minutos, se enfriaron 2 minutos en hielo, se les agregó 1,5 µl de bromuro de etidio 0,1% y 2 µl *buffer* de siembra (azul de bromo-fenol 1%, glicerol 50%). La corrida electroforética se realizó en *buffer* MOPS 1X conteniendo 6% de formaldehído, a 100 V en frío (bandeja con hielo).

Los geles se fotografiaron utilizando el equipo Fotodyne y el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

### 9.4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de amplificación por PCR y de reacciones de digestión enzimática fueron purificados a partir de geles de agarosa. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (sección 9.3.1) y la banda del tamaño esperado se escindió del gel utilizando un bisturí. La purificación se realizó con el kit comercial *Illustra GFX™ PCR DNA and gel band*

*purification kit* (GE Healthcare). El ADN obtenido fue resuspendido en 20 µl de Tris 10 mM pH 8.

### 9.5. Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones plasmídicas se utilizaron 100 a 500 ng de ADN, 1-5 U de enzima (Promega), *buffer* de restricción correspondiente 10X y albúmina sérica bovina 100x (BSA 10 mg/ml) en un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron 3 horas a la temperatura recomendada para cada enzima. En caso de ser necesario, las enzimas se inactivaron luego de la digestión según las recomendaciones del fabricante.

### 9.6. Desfosforilación de extremos 5' del ADN

A partir de un fragmento de ADN linealizado, previamente digerido con una enzima de restricción, se llevó a cabo la reacción de defosforilación. Se utilizaron 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de calamar (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP, Promega) y el *buffer* de reacción correspondiente. La incubación se realizó durante 45 minutos a 37°C. Luego la enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 minutos.

### 9.7. Ligación de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10 µl. Se utilizaron 50 ng de vector, 1 µl de *buffer* de la enzima T4 DNA ligasa 10X (Promega), 0,5-1,5 U de T4 DNA ligasa (Promega) e inserto en relación 3:1 con el vector. La cantidad de inserto para cada reacción se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{Kpb inserto}}{\text{Kpb vector}} \times \frac{3}{1}$$

Se incluyó un control de vector sin inserto para estimar el aporte de vector sin digerir o vector religado al número de colonias transformantes.

Las reacciones se incubaron 48 horas a 4°C y luego se utilizaron para transformar bacterias competentes.

## 9.8. Transformación de bacterias competentes

Cincuenta  $\mu$ l de bacterias competentes (sección 9.8.1.) fueron transformadas con 5  $\mu$ l del producto de ligación o con 50 ng de vector circularizado, según correspondiera. Luego de incubar 30 minutos en hielo, se realizó un *shock* térmico incubando las bacterias a 42°C durante 1,5 minutos e inmediatamente incubando en hielo por 3 minutos. Posteriormente se agregaron 800  $\mu$ l de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Finalmente se centrifugó a 13.000 rpm por 30 segundos, se volcó el sobrenadante y el *pellet* de bacterias fue resuspendido en 50  $\mu$ l de medio LB y sembrado en medio LB agar en presencia del antibiótico apropiado. Se sembró la totalidad del volumen de bacterias cuando se transformó con un producto de ligación y una dilución al décimo cuando se transformó con un vector no digerido. Para los vectores pGEM-T *easy*, pRSET-A y sus derivados se utilizó ampicilina como agente selector y para el vector pECFP-N1 y sus derivados kanamicina.

A partir de las colonias crecidas en placa se inocularon cultivos líquidos de 3 a 5 ml de LB con antibiótico adecuado.

### 9.8.1. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes se obtuvieron mediante el método de Hanahan (1985). Brevemente, se picó una colonia de la cepa bacteriana correspondiente a partir de un cultivo de 24 horas en medio sólido y se incubó en 2 ml de medio LB líquido a 37°C en agitación por 16 horas. Luego se diluyó el inóculo bacteriano 1:200 en 200 ml finales de medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta que la DO<sub>550</sub> alcanzó un valor de 0,48.

El cultivo bacteriano se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en 80 ml de solución TFB I (KAc 30 mM, RbCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM pH 5,8). Éste se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C. Luego el *pellet* se resuspendió en 8 ml de solución TFB II (MOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, RbCl 10 mM, 15% glicerol, pH 6,5). Se incubó en hielo 15 minutos y finalmente se fraccionó y almacenó a -70°C hasta el momento de su utilización.



## **9.9. Preparación de ADN plasmídico**

### **9.9.1. Purificación rápida de ADN plasmídico para el análisis de construcciones**

Se utilizó una modificación del método descrito en el *kit* comercial *Plasmid Mini-Prep* (Qiagen). Se partió de 1,5 ml de cultivo bacteriano crecido en medio LB con antibiótico durante 16 horas a 37°C en agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 13.000 rpm y se resuspendieron utilizando vortex en 300 µl de solución P1 (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregaron 300 µl de solución P2 (SDS 1%, NaOH 0,2 N), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de solución P3 (AcK 3 M, pH 5,2), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio, se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. El precipitado de ADN se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O deionizada. Se tomaron 3 µl para analizar por digestión con enzimas de restricción.

### **9.9.2. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad**

Se utilizó el *kit* comercial *Micro Plasmid Prep* (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante y resuspendiendo el ADN en 50 µl H<sub>2</sub>O deionizada estéril. Se obtuvo un rendimiento de 50-100 ng/µl.

La purificación de ADN plasmídico de alta calidad para los ensayos de transfección de células eucariotas se realizó con el *kit HiSpeed Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Se siguieron las indicaciones del fabricante y finalmente el ADN se resuspendió en 500 µl H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Se obtuvo un rendimiento de 500-800 ng/µl.

En todos los casos, la concentración de ADN se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro UV Nanodrop ND-1000.

## **10. Secuenciación automática**

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR y de las construcciones plasmídicas obtenidas se realizó en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación-

Ibiatec (Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Castelar). Se utilizó el *kit Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) y el secuenciador *3130 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Todas las secuencias se realizaron en ambas cadenas de ADN.

## 11. Herramientas bioinformáticas

El acceso a la secuencia genómica de BoHV-5 (GenBank acceso n° AY261359) se realizó utilizando el sitio *web* de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

La edición, el análisis y alineamiento de las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas se realizó con los programas VectorNTI versión 8.0 (InforMax, Inc, 1994-2002), BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y con las herramientas del sitio *web* JustBio.com de acceso libre a través de internet ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)).

El porcentaje de GC del gen codificante para Us3 se calculó utilizando la consulta *Oligo Calculador*, *Molecular Biology Core Facilities*, *Dana-Farber, Cancer Institute* (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>).

La predicción de dominios funcionales en la proteína Us3 de BoHV-5 se realizó con la consulta *Prosite*, disponible *on line* ([www.expasy.ch/prosite](http://www.expasy.ch/prosite)).

El análisis de regiones de alta hidrofiliidad y la presencia de epitopes B en la proteína Us3 de BoHV-5 se realizó utilizando las consultas *Hopp&Woods Antigenic/Hydrophilic* (<http://www.justbio.com/plots/index.php>) y *predicted antigenic peptides*, (<http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>).

La predicción de sitios de fosforilación en la proteína Us3 de BoHV-5 se realizó con la consulta *NetPhos 2*, disponible *on line* en el sitio *expasy* ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)).

El formato pdb y la estructura terciaria de la proteína Us3 de BoHV-5 se obtuvieron por homología de secuencias a partir del sitio <http://swissmodel.expasy.org>.

La formación de homodímeros de la proteína Us3 se predijo utilizando la herramienta *Symmdock* (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock>) Los resultados obtenidos se visualizaron con el programa ViewerLite Version 4.2 (<http://www.accelrys.com/viewer>).

## **12. Análisis de la expresión del gen *us3***

### **12.1. Análisis de transcritos del gen *us3* por *Northern Blot***

Las muestras de ARN (10 µl) se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa desnaturalizantes, tal como se describió en la sección 9.3.2. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó y equilibró en solución SSC 10X (NaCl 87,65 g/L, citrato de sodio 44,1 g/L, pH 7) durante 30 minutos. El gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon equilibrada en la misma solución, como se describe en Ausubel *et al.* (1994). Luego, la membrana de nylon se lavó 1 vez utilizando solución SSC 10X, se secó a temperatura ambiente y los ácidos nucleicos se fijaron durante 2 minutos utilizando 0,12 joules/cm<sup>2</sup> de radiación UV. La membrana se almacenó a temperatura ambiente hasta realizar la hibridación.

En los ensayos de *Northern Blot* se utilizaron como sondas un fragmento interno del gen *us3* de 338 nt comprendido entre las posiciones 79 y 417 y el gen gG completo de BoHV-5 de 1323 nt.

#### **12.1.1. Hibridación de las membranas de Nylon**

Para el análisis por hibridación de las membranas de nylon transferidas, éstas se prehibridaron con 10 ml de solución comercial *Ultra Hyb* (Ambion) durante 1 hora a 42°C en horno de hibridación rotatorio. Luego, la sonda marcada radiactivamente (sección 12.1.2.) se desnaturalizó y se agregó en el mismo tubo donde se reemplazó la solución por otros 10 ml de *Ultra Hyb* precalentados a 42°C. Se incubó en el horno de hibridación rotatorio durante 16-18 horas a 65°C. Luego, se descartó la solución de hibridación y la membrana se lavó dos veces con SSC 2X/SDS 0,1% y una vez con SSC 0,5X/SDS 0,1 %, durante 20 minutos a 42°C. Las autorradiografías se realizaron con película *X-O-Mat* (Kodak) y pantalla intensificadora a -70°C por períodos de tiempo variables.

Para poder re-hibridar la membrana de nylon con una sonda diferente, se eliminó la primera sonda unida (*strip-off*) realizando 3 lavados con una solución de SDS 0,1% precalentada a 100°C. La membrana se incubó en la solución hasta alcanzar temperatura ambiente.

<sup>1</sup>Preparada a partir de una solución madre SSC 20X: NaCl 175,3 g/L, citrato de sodio 88,2 g/L, pH 7.

### **12.1.2. Marcación de sondas de ADN con fósforo radiactivo**

La marcación de las sondas se realizó mediante el método de iniciación al azar de la polimerización empleando el *kit Mega Prime DNA Labelling System* (Amersham), siguiendo las instrucciones descriptas por el fabricante. En general, la muestra de ADN se amplificó por PCR a partir de templados previamente caracterizados y el fragmento amplificado se purificó a partir de geles de agarosa. Cada reacción se realizó a partir de 25 ng de ADN desnaturalizado y 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. La sonda se preparó y utilizó el mismo día. Antes de hibridar, se desnaturalizó la sonda por el agregado de 1 volumen de NaOH 0,4 N e incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

## **12.2. Análisis de la expresión de la proteína Us3**

### **12.2.1. Cinética de expresión de la proteína Us3 durante la infección con BoHV-5**

Para estudiar la cinética de expresión de la proteína Us3, monocapas de células MDBK crecidas en p60 fueron infectadas con BoHV-5 a MOI 1. Las células se incubaron a 37°C durante 2; 4; 6; 8; 16; 20; 24 y 48 horas y se procedió luego a la extracción de proteínas tal como se indica a continuación (sección 12.2.1.1.).

#### **12.2.1.1. Extracción de proteínas a partir de células infectadas con BoHV-5**

Monocapas de células MDBK crecidas en p60 fueron infectadas con BoHV-5 a MOI 1 e incubadas a 37°C durante distintos tiempos (sección 12.2.1) o durante 24 horas según correspondiera. Luego, se descartó el sobrenadante, se lavó la monocapa una vez con PBS 1X y se cosecharon las células en 1 ml de PBS 1X. Se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 50  $\mu$ l de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%). Se incubó en hielo por 45 minutos agitando vigorosamente cada 10 minutos. Finalmente se centrifugó 3 minutos a 8.000 rpm y el sobrenadante se utilizó para sembrar geles SDS-PAGE (sección 13.1). El mismo procedimiento se realizó con células MDBK sin infectar, utilizadas como control negativo.

### 13. Análisis de proteínas

#### 13.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de concentraciones 10% o 15%, dependiendo del tamaño de la proteína a analizar. En general, se utilizaron minigeles (*Mini Protean 3 System*, Bio-Rad). Para el armado de cada gel se utilizó:

Reactivo	Gel concentrador (2ml)	Gel separador (5ml)	
		10%	15%
Acrilamida-bisacrilamida (29:1)	0,33 ml	1,7 ml	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	---	1,3 ml	1,3 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,25 ml	---	---
SDS 10%	20 µl	50 µl	50 µl
H <sub>2</sub> O	1,4 ml	2 ml	1,2 ml
Persulfato de amonio 10%	20 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl

Las muestras de proteínas se resuspendieron en 1 volumen de *buffer* de siembra CB 2X (Tris-HCl 100 mM, glicerol 20%, SDS 4%, ditiotreitol 200 mM, azul de bromo-fenol 0,2%) o en 1/5 volumen de *buffer* de siembra CB 5X (Tris-HCl 250 mM, glicerol 50%, SDS 10%, ditiotreitol 500 mM, azul de bromo-fenol 0,5%), y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras provenientes de extractos celulares se sonicaron a intensidad media. En el caso de los geles analíticos se sembraron 10-20 µl de muestra por calle y para los geles preparativos 400 µl totales. La electroforesis se realizó en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1%) a 60 V durante la primer hora y a 100 V durante las dos horas restantes.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de *Coomassie* (sección 13.2.1.) o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para su análisis mediante ensayos de *Western blot* (sección 13.2.2.).

## 13.2. Detección de proteínas

### 13.2.1. Tinción con el colorante azul de *Coomassie*

Los geles se incubaron con una solución de azul de *Coomassie* 0,05% (*Coomassie Brilliant Blue R 250* 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2 horas con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se eliminó el exceso de colorante mediante incubación en solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 10%), que se reemplazó periódicamente. Este procedimiento se repitió hasta que el fondo del gel quedara incoloro y las bandas proteicas se visualizaran con nitidez.

### 13.2.2. Identificación de proteínas mediante *Western blot*

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron por 20 minutos con *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa (0,2  $\mu$ m), de tamaño semejante al gel a transferir, se sumergió 5 minutos en *buffer* de transferencia. Posteriormente se procedió al armado del *cassette* de transferencia (Bio-Rad) conteniendo: 1 esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), 2 papeles de filtro *Whatmann* 3MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, 2 papeles de filtro *Whatmann* 3MM y 1 esponja del tipo *Scotch Brite*. Se montó el *cassette* dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 400 mA durante 75 minutos, en frío.

Se verificó la correcta transferencia de las proteínas por tinción de la membrana de nitrocelulosa con una solución de Rojo *Ponceau* 0,1% (en ácido acético 5%) durante 5 minutos y decolorando con agua.

El bloqueo de la membrana de nitrocelulosa se realizó con una solución de PBS-*Tween* 20 0,05% (PBS-T) leche descremada 10%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpos primarios se utilizaron diluciones apropiadas de los sueros específicos o la dilución recomendada por el fabricante (1/3000) del anticuerpo comercial contra el tracto de histidinas (anti His) (Amersham). Luego se emplearon los anticuerpos antiespecie, conjugados a fosfatasa alcalina (ALP, *alkaline phosphatase* -Kirkegaard & Perry Laboratories,

KPL) o peroxidasa de rábano (HRP, *horse radish peroxidase*, KPL). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS-T-leche descremada 10% y las incubaciones con la membrana fueron de 16 horas a 4°C en agitación para los anticuerpos primarios y de 1 hora a temperatura ambiente en agitación para los anticuerpos secundarios. Los lavados se realizaron con solución de lavado PBS-T. El revelado se realizó en 10 ml de *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) que contenía 66 µl de nitroazul-tetrazolio (50 mg/ml en dimetilformamida 70%, Gibco) y 33 µl de bromo-cloro-indoilo-fosfato (60 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Gibco). Se incubó durante 3-30 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>O y la membrana de nitrocelulosa se secó sobre papel de filtro.

Cuando se utilizaron anticuerpos antiespecie conjugados a HRP, se reveló la proteína específica por quimioluminiscencia utilizando el *kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham) según las indicaciones del fabricante.

## **14. Expresión de proteínas en bacterias**

### **14.1. Obtención de los plásmidos pRSET-Us3F1 y pRSET-Us3F2**

Los fragmentos Us3F1 y Us3F2 se encuentran comprendidos entre las posiciones nucleotídicas 79-417 y 787-1140 respectivamente, de la secuencia codificante para la proteína Us3. Ambos fragmentos fueron amplificados por PCR, purificados a partir de geles de agarosa y clonados en el vector pGEM-T *easy*, obteniéndose los plásmidos pGEM-Us3F1 y pGEM-Us3F2. La identidad de ambos plásmidos fue corroborada por secuenciación automática. Luego, los fragmentos Us3F1 y Us3F2 fueron escindidos de los plásmidos pGEM-Us3F1 y pGEM-Us3F2 por digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Los productos de digestión fueron purificados a partir de geles de agarosa.

Los insertos Us3F1 y Us3F2 fueron ligados en reacciones independientes al vector de expresión bacteriana pRSET-A, previamente digerido con las enzimas BamHI y HindIII y desfosforilado.

Luego se transformaron bacterias *E. coli* DH5  $\alpha$  competentes según lo detallado en la sección 9.8. Se realizó una extracción de ADN plasmídico a partir de 10 cultivos líquidos provenientes de colonias transformadas con pRSET-Us3F1 y pRSET-Us3F2 y se corroboró por digestión con las enzimas BamHI y HindIII la presencia del inserto en los plásmidos

obtenidos. La correcta inserción de las secuencias codificantes para Us3F1 y Us3F2 fue corroborada por secuenciación automática.

#### **14.2. Análisis de la expresión de los fragmentos Us3F1 y Us3F2**

Se transformaron bacterias *E. coli* Rosetta-gami 2 competentes con los plásmidos pRSET-Us3F1, pREST-Us3F2 y pRSET-A (control negativo). Con el fin de seleccionar los clones de bacterias que expresaran las proteínas recombinantes, se realizó un ensayo cualitativo de expresión. Para ello, 10 clones de bacterias transformadas con los plásmidos pRSET-Us3F1 y pRSET-Us3F2 y 1 clon de bacterias transformadas con pRSET-A fueron inoculados en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina a 37°C en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una DO<sub>600</sub> igual a 0,6 fueron divididos en dos fracciones (1,5 ml cada una). A una fracción de cada cultivo se le agregó IPTG en concentración final de 1mM (cultivo inducido) mientras que a la otra no (cultivo no inducido). Se incubó a 37°C y a las 2 horas post inducción (hpi) los cultivos fueron centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos. El *pellet* fue resuspendido en 200 µl de *buffer* de siembra CB 2X. Luego, 16 µl de cada muestra fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 10% y sometidos a SDS-PAGE. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se procedió a la detección inmunológica de la proteína de interés. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo específico contra el tracto de histidinas comercial en una dilución 1:3000 en PBS-T-leche 10% y como anticuerpo secundario un anticuerpo específico contra ratón hecho en cabra (KPL) conjugado a ALP en una dilución 1:2000. Finalmente se reveló tal como se explicó anteriormente (sección 13.2.2).

#### **14.3. Análisis de la expresión del fragmento Us3F2 en el tiempo**

Para determinar el tiempo óptimo de expresión del fragmento recombinante se realizó una curva de tiempo a partir de los clones seleccionados. Se inoculó una dilución 1:50 del cultivo crecido durante 16 horas a 37°C en agitación en un volumen final de 20 ml de medio LB con antibiótico y se creció a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6. La mitad de cada cultivo se indujo con IPTG y el resto se dejó como control sin inducir. Se tomaron muestras de 1,5 ml de cultivo cada 30 minutos. Considerando una tasa de replicación



bacteriana de 30 minutos, las muestras se centrifugaron y los *pellets* se resuspendieron en CB 2X según lo detallado a continuación:

Tiempo (min)	30	60	90	120	150	180
CB 2X (μl)	43	86	129	172	216	258

Las muestras se sometieron a electroforesis, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y finalmente se procedió a la detección inmunológica del fragmento Us3F2.

#### 14.4. Análisis de la solubilidad del fragmento Us3F2 recombinante

Un cultivo de 1,4 ml de bacterias transformadas con pREST-Us3F2 fue inducido con IPTG durante 30 minutos. Se obtuvo el *pellet* bacteriano por centrifugación y se lo resuspendió, en ensayos independientes, en: a) *buffer* de lisis (*buffer* fosfato conteniendo *Tween* 20 y mercaptoetanol); b) Urea 8M y c) Guanidinio 6M. El homogenato se congeló y descongeló una vez, se sonicó a intensidad media y se centrifugó 20 minutos a 9.000 x g. Se separaron los sobrenadantes (fracción soluble) y los *pellets* (fracción insoluble) se resuspendieron en *buffer* de lisis. Se analizó la presencia de la proteína recombinante en todas las fracciones mediante *Western blot* y se determinó la solubilidad del fragmento Us3F2.

#### 14.5. Extracción secuencial de Us3F2

Luego de haber determinado cómo solubilizar el fragmento Us3F2 (sección 14.4) se trabajó con un cultivo de bacterias transformadas con pREST-Us3F2 de mayor volumen. Un cultivo de 15 ml fue inducido con IPTG durante 30 minutos y el *pellet* proveniente del mismo fue resuspendido en 1,8 ml de *buffer* de lisis, agitado con vortex 2 veces y congelado a -20°C por 30 minutos. Luego fue sonicado 2 pulsos a intensidad media y centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante (S1) fue almacenado a -20°C para su posterior análisis. El *pellet* fue resuspendido en 1,7 ml de Urea 8M y centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante (S2) fue almacenado a -20°C para su posterior análisis por *Western blot*.

#### 14.6. Purificación del fragmento Us3F2 por columna de Ni-NTA

El fragmento Us3F2 fue purificado a partir de la fracción S2 utilizando la resina Ni-NTA agarosa (Qiagen), en condiciones desnaturalizantes, según las indicaciones del fabricante. Previo a su utilización, la resina fue lavada 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada y 2 veces con *buffer* de unión desnaturalizante pH 8 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris Cl 10 mM, urea 8 M). Los lavados se realizaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, 500 µl de la fracción S2 y 500 µl de *buffer* de unión desnaturalizante fueron agregados a la resina. Se incubó durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 1.500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se juntó el percolado (1 ml), el cual fue almacenado a -20°C para su posterior análisis. Luego se realizaron eluciones con concentraciones crecientes de histidina: 50, 75, 100, 150 y 200 mM (tres eluciones con 200 µl de cada una de las soluciones de histidina). Todas las fracciones fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis por *Western blot*. Las fracciones en las que se detectó el fragmento Us3F2 recombinante fueron unificadas. Para estimar la concentración del fragmento Us3F2 purificado, 16 µl de muestra fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 15% junto a una curva patrón de BSA (50; 100; 200; 400; 600; 800 y 1000 ng de BSA). Se realizó la electroforesis y se tiñó el gel con azul de *coomassie*. La estimación de la concentración del fragmento Us3F2 se realizó por comparación de la intensidad del color azul con los puntos de la curva de BSA.

#### 15. Producción de suero de ratón específico contra el fragmento Us3F2

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 3 meses de edad, los cuales fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. El manejo de los animales se realizó bajo normas de bienestar animal (Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación, INTA; *Guide for the Care and use of laboratory animals*, Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA).

Cinco µg por dosis del fragmento Us3F2 purificado fueron formulados en adyuvante incompleto de *Freund* e inoculados en seis ratones BALB/c por vía intraperitoneal, aplicándose tres dosis de refuerzo a intervalos de 15 días. A los 7 días de la última

inoculación, los animales fueron sangrados, se obtuvo el suero por centrifugación de la sangre durante 1 minuto a 13.000 rpm y éste fue conservado a -20°C hasta su utilización.

## **16. Análisis del suero de ratón específico contra el fragmento Us3F2**

### **16.1. Western Blot para detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína Us3F2 recombinante**

Diesciseis µl por calle de la proteína Us3F2 purificada fueron diluidos en *buffer* de siembra CB 5X y sembrados en un gel de poliacrilamida 15%. Se realizó la electroforesis y la electrotransferencia según lo descrito anteriormente.

Para analizar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína Us3F2 en el suero de ratón obtenido se realizaron diluciones 1:50; 1:75 y 1:100 en PBS-T-leche 10% de dicho suero y se incubó la membrana durante 16 horas a 4°C en agitación. Luego se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Se utilizó un anticuerpo específico contra ratón conjugado con HRP en una dilución 1:2000 en PBS-T- leche 10%. Luego se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y finalmente se reveló por quimioluminiscencia, utilizando el *Kit* ECL.

### **16.2. Inmunocitoquímica para detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína Us3F2 recombinante**

Monocapas de células MDBK crecidas en placas de 24 pocillos sobre laminillas fueron infectadas con BoHV-5 cepa A663 a MOI 1 y 0,01. A las 16 hpi (MOI 1) y a las 24 hpi (MOI 0,01), las células fueron fijadas con PFA 4% durante 10 minutos, permeabilizadas con tritón X-100 0,1% durante 2 minutos e incubadas 16 horas a 4°C con el suero de ratón específico contra la proteína Us3F2 obtenido en diluciones 1:50 y 1:100. Posteriormente, las células fueron incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo específico contra ratón biotinilado (Dako) y luego incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina-HRP (Dako). Finalmente se reveló por tratamiento con una solución de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (AEC 0,1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en *buffer* acetato pH 5) durante 20 minutos

a 37°C y las laminillas fueron montadas sobre un portaobjetos con glicerina para su visualización al microscopio óptico.

## **17. Expresión de las proteínas Us3 y Us3K261D en células eucariotas**

### **17.1. Construcción del plásmido pECFP-Us3**

El fragmento Us3f, correspondiente al marco abierto de lectura completo de la proteína Us3, fue amplificado por PCR, purificado a partir de gel de agarosa y clonado en el vector pGEM-T *easy*, obteniéndose el plásmido pGEM-Us3f, cuya identidad fue corroborada por secuenciación automática.

El plásmido pGEM-Us3f fue digerido secuencialmente con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El inserto liberado fue purificado a partir de geles de agarosa y clonado en el vector pECFP-N1, previamente digerido con las enzimas BamHI y EcoRI y desfosforilado por tratamiento con la enzima SAP. Se obtuvo el plásmido pECFP-Us3 y la correcta inserción del inserto fue corroborada por secuenciación.

### **17.2. Construcción del plásmido pECFP-Us3K261D**

Los fragmentos Us3Nm y Us3Cm, codificantes para los fragmentos comprendidos entre los aminoácidos 1-261 y 261-444, respectivamente, fueron amplificados por PCR, purificados a partir de geles de agarosa y clonados en el vector pGEM-T *easy*. Así, se obtuvieron los plásmidos pGEM-Us3Nm y pGEM-Us3Cm, cuya identidad fue corroborada por secuenciación.

El plásmido pGEM-Us3Nm fue digerido secuencialmente con las enzimas de restricción EcoRI y SalI. El inserto liberado fue purificado a partir de geles de agarosa y clonado en el vector pECFP-N1, previamente digerido con las enzimas EcoRI y SalI y desfosforilado por tratamiento con la enzima SAP, obteniéndose el plásmido pECFP-Us3Nm. Posteriormente, el fragmento Us3Cm obtenido por digestión secuencial del plásmido pGEM-Us3Cm con las enzimas SalI y BamHI fue subclonado en el plásmido pECFP-Us3Nm, previamente digerido con las enzimas SalI y BamHI y desfosforilado por tratamiento con la enzima SAP. Se obtuvo el plásmido pECFP-Us3K261D y la correcta inserción de los

fragmentos Us3Nm y Us3Cm y la presencia de la mutación generada fueron corroboradas por secuenciación.

### **17.3. Ensayos de transfección transitoria**

Monocapas de células BHK-21 y VERO fueron crecidas al 70% de confluencia en placas de 24 pocillos o en p60. Las transfecciones se realizaron con lipofectamina según las indicaciones del fabricante (Invitrogen) y como medio de cultivo se utilizó OPTI-MEM (Gibco). Se utilizaron 0,5 µg de ADN plasmídico y 2,5 µl de lipofectamina por pocillo en placas de 24 pocillos y 1 µg de ADN plasmídico y 22,5 µl de lipofectamina por p60. En los ensayos de co-transfección (pTrip + pECFP-N1, pECFP-Us3 o pECFP-Us3K261D) se utilizaron 0,4 µg de cada uno de los plásmidos por pocillo en placa de 24 pocillos. Las células fueron lavadas dos veces con OPTI-MEM y se incubaron con la mezcla ADN + lipofectamina durante 3 horas a 37°C. Luego, se retiró la mezcla, se lavó dos veces con OPTI-MEM y se agregó medio fresco conteniendo 2% de SFB (MEM-D para la línea celular BHK-21 y 50:50 MEM-E:MEM-D para la línea celular VERO). Las células fueron incubadas a 37°C por 24 o 48 horas. A partir de las transfecciones realizadas en p60 se analizó la expresión de las proteínas Us3-ECFP y Us3K261D-ECFP (sección 17.4.), mientras que las transfecciones realizadas en placas de 24 pocillos se utilizaron para los ensayos de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (sección 18).

### **17.4. Análisis de la expresión de las proteínas de fusión Us3-ECFP y pECFP-Us3K261D**

#### **17.4.1. Inmunodetección por *Western Blot***

Monocapas de células BHK-21 y VERO crecidas en p60 fueron transfectadas en ensayos independientes con los plásmidos pECFP-N1, pECFP-Us3 y pECFP-Us3K261D. A las 24 y 48 hpt se realizó la extracción de proteínas tal como se describe en la sección 12.2.1.1.

Dieciséis µl por calle del extracto proteico obtenido a partir de las células transfectadas con pECFP-N1, pECFP-Us3 y pECFP-Us3K261D, fueron diluidos en *buffer* de siembra CB 5X y sembrados en un gel de poliacrilamida 10%, se realizó la electroforesis y la electrotransferencia como se describió anteriormente.

La detección inmunológica de las proteínas Us3-ECFP y Us3K261D-ECFP se realizó por *Western Blot*. Como anticuerpo primario se utilizó una dilución 1:75 en PBS-T-leche 10% del suero específico contra Us3F2 obtenido en ratón. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo específico contra ratón conjugado con HRP en una dilución 1:2000 en PBS-T-leche 10%. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

## **18. Estudio de la función de la proteína Us3 de BoHV-5 en células eucariotas**

### **18.1. Visualización por microscopia de fluorescencia**

Para estudiar la localización subcelular y los efectos de las proteínas Us3-ECFP y Us3K261D-ECFP en la morfología celular, las células transitoriamente transfectadas con los plásmidos pECFP-N1, pECFP-Us3, pECFP-Us3K261D y pTrip fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus LH50A con lámpara UV.

### **18.2. Marcación del citoesqueleto de actina**

Para evaluar los efectos de las proteínas Us3-ECFP y Us3K261D-ECFP sobre el citoesqueleto de actina, monocapas de células BHK-21 y VERO crecidas sobre laminillas en placas de 24 pocillos ( $1.10^4$  células/ml) fueron co-transfectadas con los plásmidos pECFP-N1 + pTrip, pECFP-Us3 + pTrip o pECFP-Us3K261D + pTrip según lo descrito en la sección 17.3. A las 24 hpt las células fueron lavadas con 500  $\mu$ l de PBS 1X y fijadas con 500  $\mu$ l de PFA 4% durante 10 minutos. Luego fueron lavadas con 500  $\mu$ l de PBS 1X y permeabilizadas con 500  $\mu$ l de tritón X-100 0,1% durante 2 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con 500  $\mu$ l de PBS 1X y la marcación del citoesqueleto de actina se realizó por incubación con 5 U de faloidina-*Texas Red* (Invitrogen) en 250  $\mu$ l de PBS 1X durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Finalmente las células fueron lavadas 2 veces con 500  $\mu$ l de PBS 1X y montadas sobre un portaobjetos con glicerina para su posterior visualización al microscopio confocal.

#### **18.2.1 Microscopía confocal**

Las células transitoriamente transfectadas con los plásmidos pECFP-N1, pECFP-Us3, pECFP-Us3K261D y pTrip y marcadas con faloidina-*Texas Red*, fueron visualizadas y fotografiadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (del Departamento de Virología, Parasitología e

inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Ghent, Bélgica) o TCS SP5 (del Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar). Se utilizó un láser Gre/Ne 543 nm para excitar Texas Red y un láser de Argón 488 nm para excitar las diferentes variantes de proteínas fluorescentes verdes (GFP o CFP) .

## Resultados



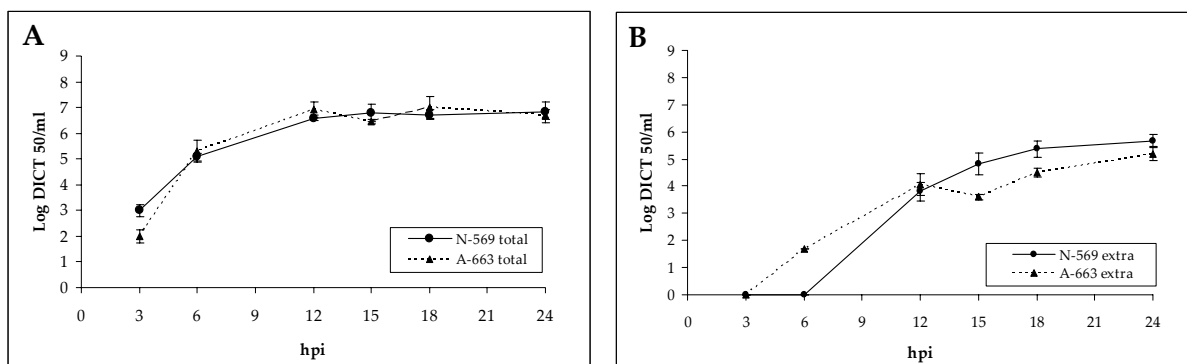
## 1. Estudios comparativos *in vitro* entre las cepas A663 y N569 de BoHV-5

Con el objetivo de conocer los parámetros relacionados con la replicación *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5 se estudió la cinética de replicación y el tamaño de la placa de lisis y de infección que esta cepa produce luego de la infección de monocapas de células MDBK. Paralelamente, los mismos ensayos fueron realizados con la cepa de referencia N569 de BoHV-5. Las cepas N569 y A663 son cepas de referencia pertenecientes a los subtipos a y b de BoHV-5, respectivamente.

Con el propósito de establecer la cinética de crecimiento de las cepas A663 y N569 de BoHV-5, monocapas de células MDBK fueron infectadas a MOI 5 y 0,1 (cinética de un único paso y de múltiples pasos, respectivamente) e incubadas a 37°C por distintos tiempos, según se detalla en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Las cinéticas de un único paso permiten evaluar la producción de partículas virales infectivas y la salida de virus al medio extracelular, mientras que en las cinéticas de múltiples pasos es también posible evaluar la dispersión célula a célula.

En la cinética de replicación de un único paso, los títulos virales alcanzados por las fracciones totales indican que la producción de partículas virales infectivas fue similar para ambas cepas en todos los tiempos ensayados (Fig. 1), alcanzándose la producción máxima a las 18 horas post infección (hpi) ( $10^{7,0}$  DICT<sub>50</sub>/ml) y 24 hpi ( $10^{6,8}$  DICT<sub>50</sub>/ml) para A663 y N569, respectivamente.

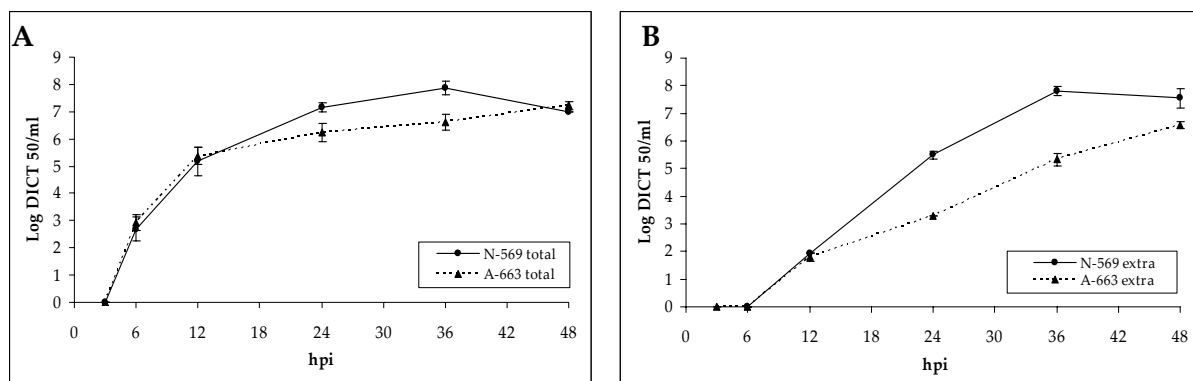
La salida de partículas virales infectivas al medio extracelular ocurrió primero en la cepa A663, detectándose a las 6 hpi ( $10^{1,7}$  DICT<sub>50</sub>/ml) (Fig. 1). La salida al medio extracelular de la cepa N569 estuvo retrasada ya que fue detectable recién a las 12 hpi, sin embargo, a partir del tiempo 15 hpi se observó que el título de esta fracción era mayor que el de la cepa A663 ( $10^{4,8}$ ,  $10^{5,4}$  y  $10^{5,7}$  DICT<sub>50</sub>/ml para N569 y  $10^{3,6}$ ,  $10^{4,5}$  y  $10^{5,2}$  DICT<sub>50</sub>/ml para A663 a las 15, 18 y 24 hpi, respectivamente) (Fig. 1).



**Figura 1:** Cinética de crecimiento de un único paso de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 (MOI 5). **A:** títulos virales de las fracciones totales. **B:** títulos virales de las fracciones extracelulares. Los títulos virales se expresaron como  $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub>/ml. hpi: horas post infección.

Estos resultados indicarían que ambas cepas fueron capaces de replicar produciendo cantidades similares de partículas virales infectivas y que, si bien ocurrió más tempranamente, la salida de las partículas virales al medio extracelular fue menos eficiente para la cepa A663 que para la cepa N569, sugiriendo que la cepa A663 tendría una menor capacidad lítica que la cepa N569.

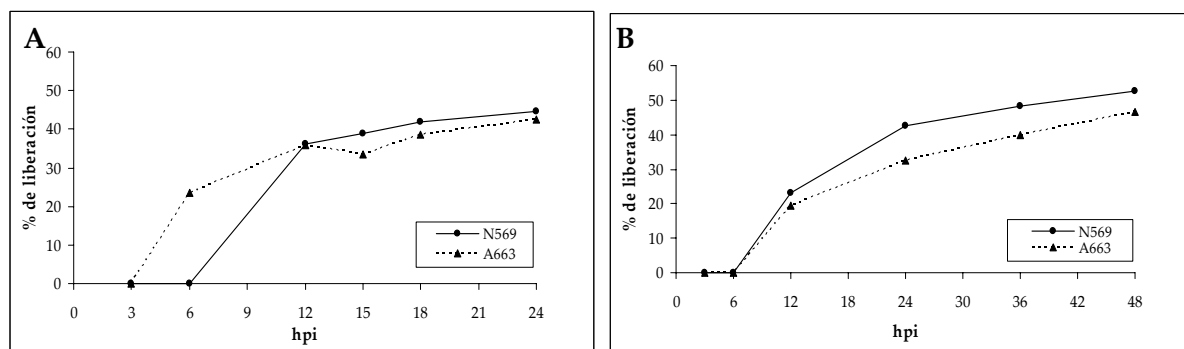
La cinética de crecimiento de múltiples pasos mostró que a tiempos tempranos, antes de las 12 hpi, los títulos virales de las fracciones total y extracelular fueron similares entre ambas cepas de BoHV-5 (Fig. 2), mientras que a las 24 y 36 hpi los títulos alcanzados por la fracción total de N569 fueron mayores que los alcanzados por la misma fracción de A663 ( $10^{7.1}$  y  $10^{7.9}$  DICT<sub>50</sub>/ml para N569 y  $10^{6.2}$  y  $10^{6.6}$  DICT<sub>50</sub>/ml para A663 a las 24 y 36 hpi, respectivamente). Esta diferencia fue aún más notable para la fracción extracelular ( $10^{5.5}$  y  $10^{7.9}$  DICT<sub>50</sub>/ml para N569 y  $10^{3.3}$  y  $10^{5.3}$  DICT<sub>50</sub>/ml para A663 a las 24 y 36 hpi, respectivamente).



**Figura 2:** Cinética de crecimientos de múltiples pasos de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 (MOI 0,1). **A:** títulos virales de las fracciones totales. **B:** títulos virales de las fracciones extracelulares. Los títulos virales se expresaron como Log<sub>10</sub> DICT50/ml. hpi: horas post infección.

En concordancia con lo observado en la cinética de un único paso, estos resultados indicarían una salida menos eficiente de las partículas virales al medio extracelular para la cepa A663. Además, por tratarse de una cinética de múltiples pasos realizada a baja multiplicidad de infección la cual permite evaluar la dispersión célula a célula, estos resultados indicarían que también esta forma de diseminación viral sería menos eficiente para la cepa A663 respecto de la cepa N569.

El porcentaje de virus total liberado al medio extracelular se definió como el cociente entre la fracción extracelular y la suma de las fracciones intra y extracelulares ( $[\text{extracelular} / (\text{intracelular} + \text{extracelular})]$ ). Este porcentaje fue siempre mayor para la cepa N569, excepto para el tiempo 6 hpi a MOI 5, y además se observaron mayores diferencias entre ambas cepas en la cinética de múltiples pasos (Fig. 3).



**Figura 3:** Porcentaje de liberación viral para las cepas A663 y N569 de BoHV-5. **A:** a MOI 5. **B:** a MOI 0,1. % de liberación = [extracelular/ (intracelular + extracelular)].

En conjunto, los datos obtenidos a partir de las cinéticas de un único y múltiples pasos indicarían que la liberación de partículas virales al medio extracelular y la dispersión célula a célula serían menos eficientes para la cepa A663 que para la cepa N569.

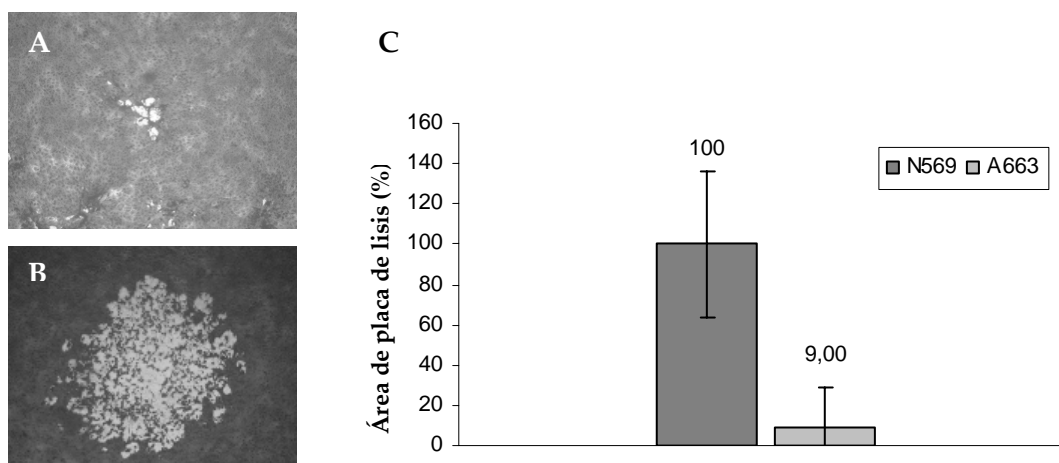
Para comprender mejor los resultados obtenidos a partir de las cinéticas de crecimiento y eliminar el componente poblacional propio de esa metodología, se analizaron los tamaños de placa de lisis y de infección generados al infectar monocapas de células MDBK con las cepas A663 y N569.

La determinación del tamaño de placa de lisis es un parámetro importante para la caracterización *in vitro* de los virus. Esta característica es una medida directa del potencial lítico de un virus así como una medida indirecta de la dispersión célula a célula del mismo.

Se realizaron ensayos para comparar el tamaño de placa de lisis generado por ambas cepas de BoHV-5 al infectar monocapas de células MDBK. Se observó que el tamaño de las placas de lisis generadas por la cepa A663 era 90% más pequeño que el generado por la cepa N569 (Fig. 4).

El tamaño de placa depende de la lisis generada sobre monocapas de células infectadas con partículas virales presentes en el medio extracelular, ya sea inóculo o progenie viral, o con partículas dispersadas célula a célula. Debido a la gran diferencia observada entre ambas cepas de BoHV-5, además de un potencial lítico mayor y una liberación más

eficiente de partículas virales al medio extracelular de la cepa N569, se podría sugerir que existe una mayor dispersión célula a célula para ésta cepa.

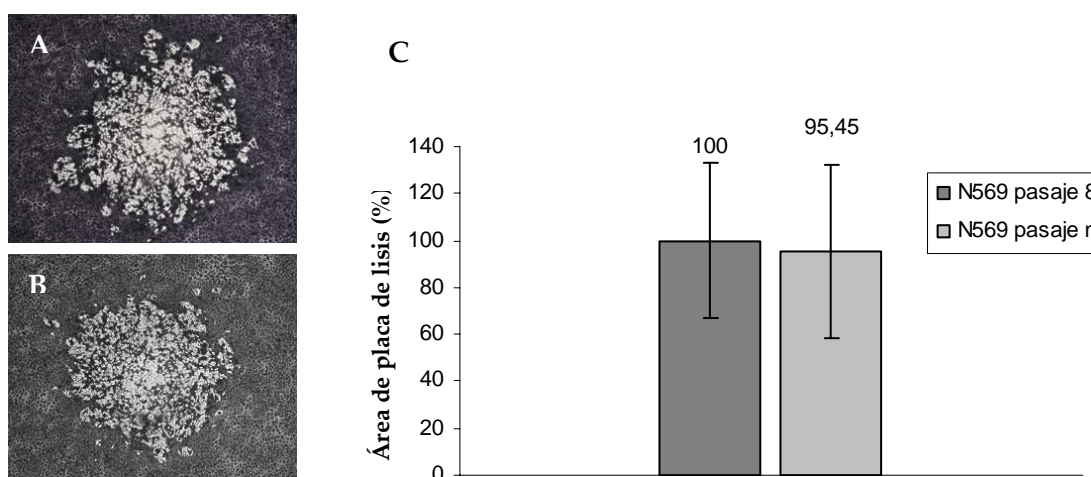


**Figura 4:** Placas de lisis generadas por las cepas A663 (A) y N569 (B) de BoHV-5. Aumento 40x. C: Relación entre el tamaño de placa de lisis generado por ambas cepas. El promedio de las áreas de lisis correspondientes a N569 se estableció como el 100%. N569 y A663 difieren significativamente:  $p < 0,01$ .

Debido a la gran diferencia de tamaño de placa de lisis observada entre ambas cepas de BoHV-5 y teniendo en cuenta que este parámetro podría estar relacionado con la adaptación viral al crecimiento en cultivos celulares, se planteó el siguiente interrogante: ¿podría la diferencia en el número de pasajes por células entre ambas cepas ser causal de las diferencias observadas en el tamaño de placa de lisis?

El número de pasajes del *stock* viral de la cepa N569 utilizado en los ensayos anteriormente descritos es desconocido (cepa cedida por el Dr. Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liege, Bélgica), mientras que el *stock* viral de la cepa A663 utilizado correspondió a un pasaje 8. Para responder el interrogante planteado anteriormente, se obtuvo el pasaje 8 de la cepa N569 por sucesivos pasajes en la línea celular MDBK partiendo de un *stock* viral denominado “cero” que correspondió al virus excretado por un bovino experimentalmente infectado con la cepa N569 de BoHV-5 cedida por el Dr. Thiry. Luego se realizó el ensayo de tamaño de placa de lisis.

No se observaron diferencias significativas en el tamaño de placa de lisis entre las cepas N569 de número de pasaje desconocido y la cepa N569 pasaje 8 (Fig. 5) evidenciando que las diferencias observadas en el tamaño de placa de lisis entre las cepas N569 y A663 se deben a características propias de las mismas y no dependerían de las diferencias en el número de pasajes.

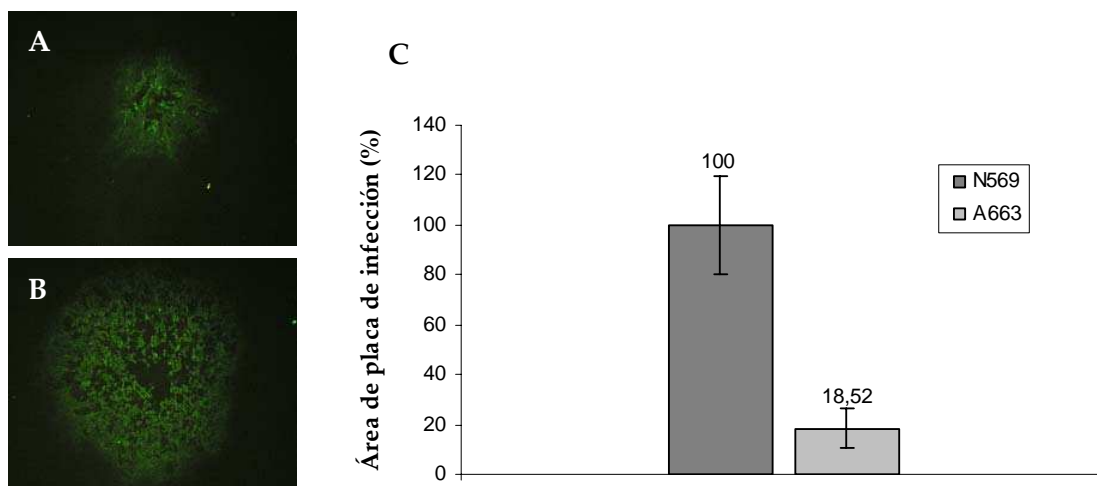


**Figura 5:** Placas de lisis generadas por la cepa N569 pasaje 8 (A) y N569 número de pasaje desconocido (B) de BoHV-5. Aumento 40x. C: Relación entre el tamaño de placa de lisis generado por ambas cepas. El promedio de las áreas de lisis correspondientes a N569 pasaje 8 se estableció como el 100%. No hay diferencias significativas entre N569 pasaje 8 y N569 número de pasaje desconocido.

Finalmente se analizó la dispersión célula a célula a través de la medición del tamaño de la placa de infección. Esta metodología consiste en la detección por inmunofluorescencia de antígenos virales presentes en la superficie de las células infectadas y, a diferencia de las cinéticas de múltiples pasos, permite la observación directa del fenómeno de dispersión célula a célula a través del análisis de placas de infección individuales.

Se comparó el tamaño de la placa de infección generada por las cepas A663 y N569 de BoHV-5 luego de infectar monocapas de células MDBK y detectar antígenos virales por inmunofluorescencia. Se observó que el tamaño promedio de las placas de infección generadas por la cepa A663 era 80% más pequeño que el generado por la cepa N569 (Fig. 6).

Esto indicaría que, además de la capacidad lítica, la dispersión célula a célula se encuentra disminuida en la cepa A663 respecto de la cepa N569.



**Figura 6:** Detección de las placas de infección generadas por las cepas A663 (A) y N569 (B) de BoHV-5 sobre monocapas de células MDBK por inmunofluorescencia contra antígenos virales. Aumento 40x. C: Relación entre el tamaño de placa de infección generado por ambas cepas. El promedio de las áreas de infección correspondientes a N569 se estableció como el 100%. N569 y A663 difieren significativamente:  $p < 0,01$ .

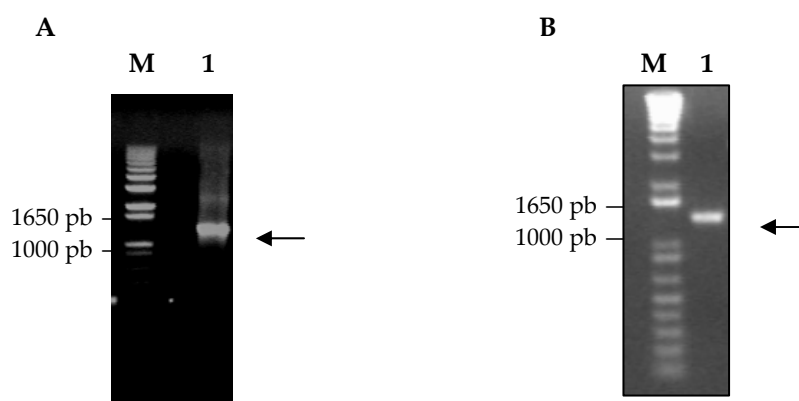
En conjunto, los resultados obtenidos al comparar *in vitro* las propiedades replicativas de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 sugieren que la cepa A663 posee una menor capacidad lítica y una dispersión célula a célula menos eficiente que la cepa N569. La liberación de partículas virales infectivas al medio extracelular sería menor para la cepa A663 mientras que la producción total de partículas virales infectivas sería similar para ambas cepas.

El estudio comparativo de las propiedades replicativas de las cepas A663 y N569 permitió conocer aspectos básicos de la replicación *in vitro*, poniendo de manifiesto diferencias entre estas cepas pertenecientes a dos subtipos diferentes de BoHV-5 y brindando una herramienta de trabajo para continuar con la caracterización de estas cepas. En este sentido, se decidió caracterizar la proteína Us3 de ambas cepas virales. En base a estudios realizados con otros alfa herpesvirus, la proteína Us3 es una proteína multifuncional implicada en diversos aspectos del ciclo de replicación de los alfa herpesvirus, por lo cual, el estudio de esta proteína permitiría dilucidar aspectos aún desconocidos sobre la biología de BoHV-5.

## 2. Estudios tendientes a la caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5

### 2.1. Obtención y secuenciación de los genes codificantes para la proteína Us3 de las cepas A663 y N569 de BoHV-5

Se amplificaron por PCR los genes codificantes para las proteínas Us3 (gen *us3*) de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 utilizando ADN genómico viral como templado y oligonucleótidos específicos. El genoma de los herpesvirus se caracteriza por poseer un alto contenido de GC (72% aproximadamente), por tal motivo fue necesario ajustar las condiciones de reacción para lograr la amplificación del gen codificante para la proteína Us3. Las variables evaluadas fueron, entre otras, *buffers* de reacción (con y sin el agregado de agentes desnaturalizantes) y programas de ciclado. Las condiciones finales de reacción se describen en la sección 9.1 de Materiales y Métodos y los programas de ciclado en el Anexo II (Condiciones de reacción y ciclado de PCR). Se obtuvieron los productos de amplificación de 1335 pb para A663 y 1374 pb para N569 (Fig. 7), que fueron clonados en el vector comercial pGEM-T *easy*, obteniéndose de esta manera los plásmidos pGEM-Us3 A663 y pGEM-Us3 N569. La identidad de ambos insertos fue confirmada por secuenciación.



**Figura 7:** Amplificación por PCR del gen codificante para la proteína Us3 de la cepa A663 (A) y N569 (B) resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. A: Calle 1: Us3 A663 (1335 pb). B: Calle 1: Us3 N569 (1374 pb). M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen).



Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia del gen codificante para la proteína Us3 de la cepa SV507/99 de BoHV-5 (Delhon et al., 2003), única cepa de BoHV-5 cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (GenBank AY261359). El porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos fue del 99% al comparar los genes codificantes para Us3 de las cepas A663 y SV507/99, y del 97% al realizar la comparación entre N569 y SV507/99. El %GC del gen *us3* fue del 74% tanto para A663 como para N569. Este valor resultó comparable al porcentaje general de GC del genoma de BoHV-5 (72%).

La secuenciación del gen codificante para la proteína Us3 de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 constituye el primer dato genómico de acceso libre para estas cepas (GenBank GQ386987 y GQ415411 para las secuencias codificantes para Us3 de las cepas A663 y N569, respectivamente).

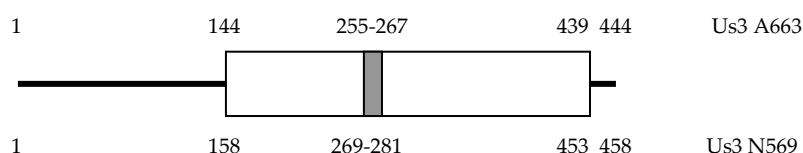
La proteína Us3 de la cepa A663, cuya secuencia primaria fue obtenida a partir de la traducción de su secuencia nucleotídica, tuvo una longitud de 444 aminoácidos y un peso molecular estimado de 48 KDa. Presentó un porcentaje de positividad del 97,5 % con la proteína Us3 de SV507/99 (BoHV-5) y del 79,1; 44,5 y 43,5 % con las proteínas Us3 de BoHV-1 (cepa Cooper, GenBank: CAA06143.1), PrV (cepa Kaplan, GenBank: BAA00581.1), HSV-1 (cepa 17, GenBank: ACM62292.1) y HSV-2 (cepa HG52, GenBank: CAB06710.1), respectivamente (Tabla 1).

Por su parte, la proteína Us3 de la cepa N569 tuvo una longitud de 458 aminoácidos y un peso molecular estimado de 49 KDa. Presentó un porcentaje de positividad del 96% con la proteína Us3 de SV507/99 (BoHV-5) y del 82,1; 43,8; 43,1 y 42,7 % con las proteínas Us3 de BoHV-1 (cepa Cooper), PrV (cepa Kaplan), HSV-1 (cepa 17) y HSV-2 (cepa HG52), respectivamente (Tabla 1).

% de positividad					
	BoHV-5 SV507/99	BoHV-1 Cooper	PrV Kaplan	HSV-1 st 17	HSV-2 HG52
BoHV-5 A663	97,5	79,1	44,5	43,1	41,3
BoHV-5 N569	96,0	82,1	43,8	43,1	42,7

**Tabla 1.** Porcentaje de positividad entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569 y proteínas Us3 pertenecientes a alfa herpesvirus relacionados.

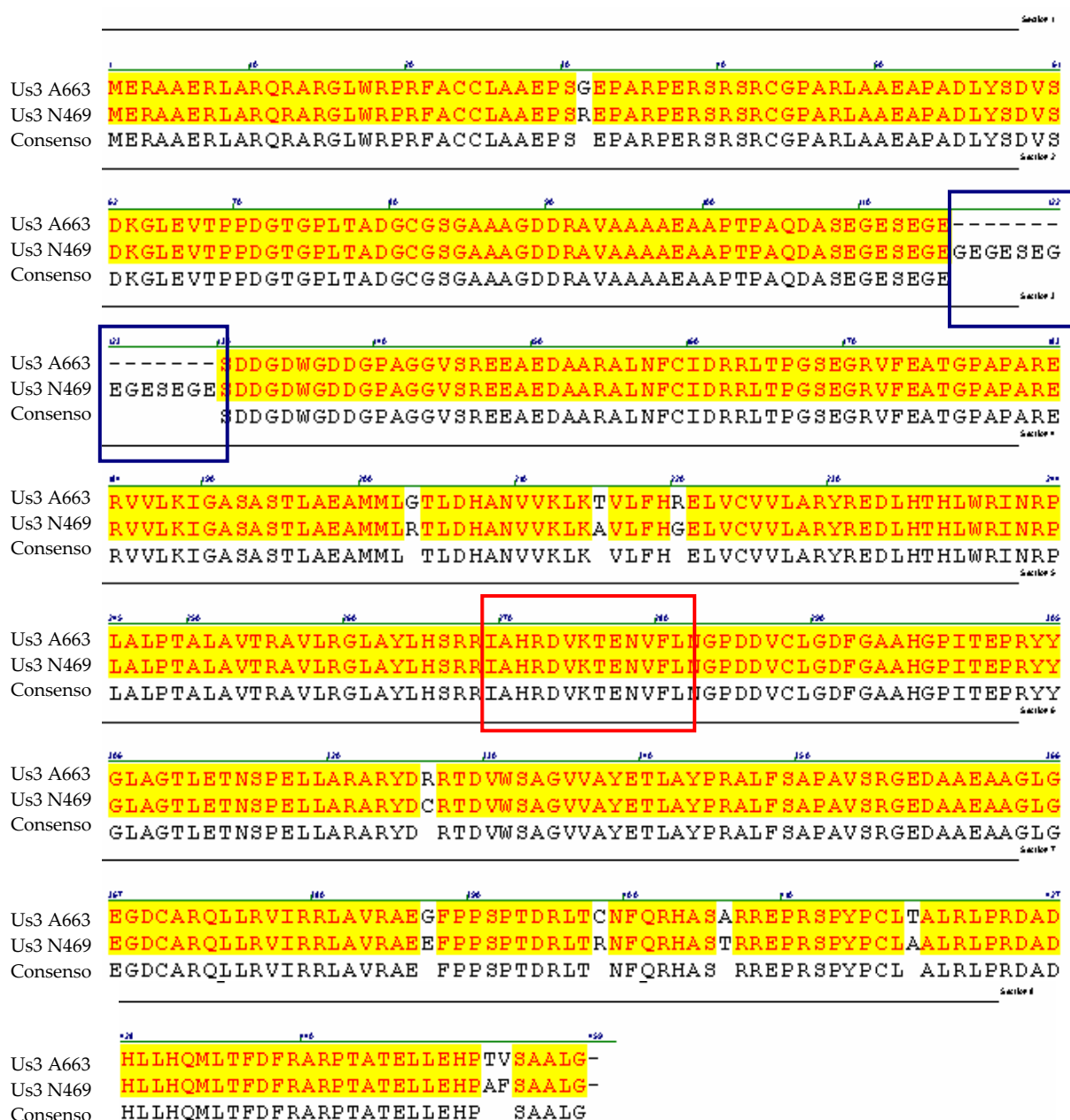
El análisis *in silico* de dominios proteicos presentes en las proteínas Us3 predichas para las cepas A663 y N569 de BoHV-5 identificó la presencia de un dominio de proteína quinasa comprendido entre los aminoácidos 144 y 439 para A663 y los aminoácidos 158 y 453 para N569 (Fig. 8). Este análisis predijo también un putativo sitio activo de serina/treonina quinasa, comprendido entre los aminoácidos 255 a 267 para A663 y los aminoácidos 269 a 281 para N569 (Fig. 8). Tanto el dominio como el sitio activo de quinasa han sido identificados previamente en las proteínas Us3 de virus relacionados.



**Figura 8:** Representación esquemática de las proteínas Us3 de BoHV-5. La línea negra indica la longitud de la proteína, el rectángulo blanco el dominio de proteína quinasa y el rectángulo gris el sitio activo de proteína quinasa. Los números en la parte superior e inferior del esquema corresponden a los aminoácidos delimitantes de las regiones mencionadas para la proteína Us3 de la cepa A663 y N569, respectivamente.

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas Us3 de la cepa A663 y N569 fueron alineadas utilizando el programa Vector NTI y se determinó que el porcentaje de positividad entre ambas proteínas era del 94,3 %.

La figura 9 muestra el alineamiento entre las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569. La diferencia más relevante se observa hacia el extremo carboxilo del aminoácido 116, posición en la cual aparece una inserción de 14 aminoácidos en la secuencia de Us3 correspondiente a la cepa N569 respecto de la secuencia de A663. Esta inserción está compuesta únicamente por los aminoácidos glicina (G), glutamina (E) y serina (S) y no genera un cambio en el marco de lectura de la proteína.



**Figura 9:** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína Us3 de las cepas A663 y N569. El recuadro azul indica la inserción de 14 aminoácidos y el recuadro rojo el sitio activo de proteína quinasa.

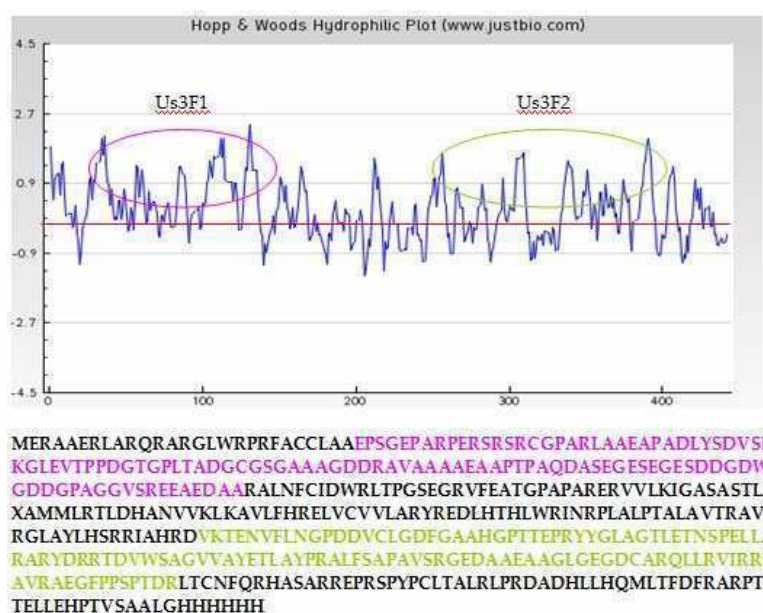
Encontrándose el dominio de proteína quinasa río abajo del sitio de inserción de la secuencia de 14 aminoácidos mencionada previamente y estando el sitio activo de quinasa perfectamente conservado entre las proteínas Us3 de ambas cepas, difícilmente las pequeñas diferencias en la secuencia primaria de estas proteínas tengan un correlato en su función. Debido a esto, se utilizó la cepa A663 para continuar con la caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5.

## **2.2 Obtención y evaluación de un suero policlonal específico contra la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5.**

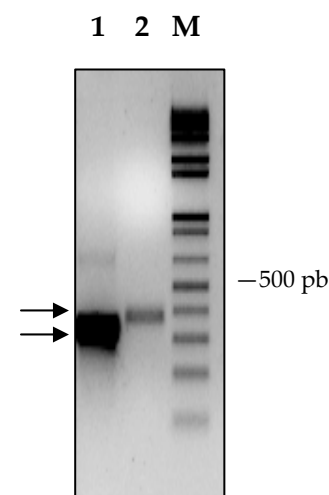
Para realizar los estudios de caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5 resultó indispensable obtener un suero específico contra esta proteína. Debido a que se presentaron dificultades en la expresión de la proteína Us3 completa en el sistema procariota, se optó por la expresión de fragmentos de la misma.

Teniendo en cuenta que las regiones hidrofílicas tienden a estar expuestas en las proteínas aumentando la posibilidad de inducir anticuerpos contra las mismas, se realizó un análisis con herramientas bioinformáticas para identificar regiones dentro de la proteína Us3 de BoHV-5 que tuvieran alta hidrofiliidad. Se identificaron dos regiones comprendidas entre las posiciones aminoacídicas 27-139 y 263-380 (Us3F1 y Us3F2, respectivamente) (Fig. 10). Las secuencias codificantes para los dos fragmentos mencionados fueron amplificadas por PCR y clonadas en vectores tipo T (Fig. 10). Luego de confirmarse su identidad por secuenciación, ambos fragmentos fueron clonados en el vector de expresión bacteriano pRSET-A de manera tal de generar una proteína de fusión a un tracto de histidinas en su extremo N-Terminal. En ambos casos el clonado se realizó de forma direccionada, utilizando las enzimas de restricción BamHI y HindIII, cuyas secuencias de reconocimiento fueron incluidas en los oligonucleótidos correspondientes utilizados en las reacciones de amplificación por PCR. Se obtuvieron las construcciones denominadas pRSET-Us3F1 y pRSET-Us3F2.

A

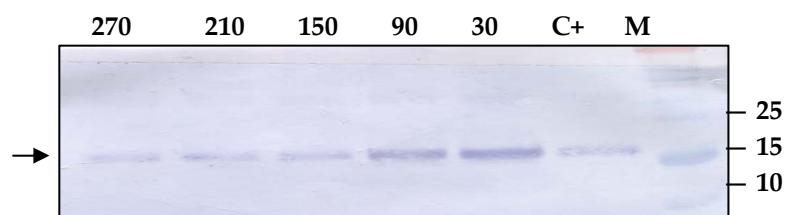


B



**Figura 10:** Fragmentos Us3F1 y Us3F2 de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5. **A:** Perfil hidrofílico (arriba). Con rosa y verde se indican las secuencias correspondientes a los fragmentos Us3F1 y Us3F2, respectivamente, sobre la secuencia completa de la proteína Us3 (abajo). **B:** Productos de amplificación por PCR resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. Calle 1: Us3F1 (336 pb), calle 2: Us3F2 (351 pb) y M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen).

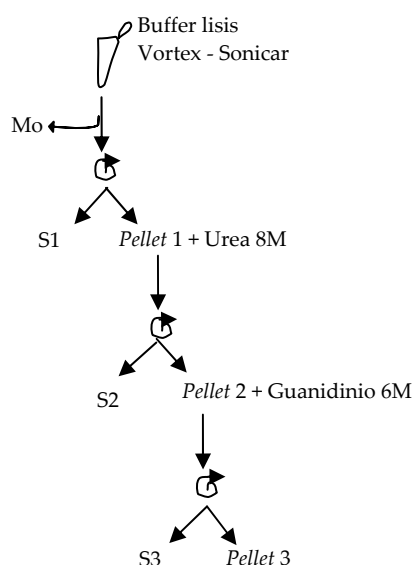
Posteriormente se obtuvieron mediante transformación bacterias *E. coli Rosetta Gami 2* que portaban los plásmidos pRSET recombinantes (pRSET-Us3F1 o pRSET-Us3F2) y se evaluó la expresión de la proteína de interés por *Western Blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra el tracto de histidinas. Si bien se utilizaron distintas condiciones de expresión, bajo ninguna de ellas fue posible detectar la expresión del fragmento Us3F1. En cambio, en la figura 11 se muestra la expresión del fragmento Us3F2 en función del tiempo para uno de los clones ensayados, observándose que la máxima expresión ocurre a los 30 minutos post inducción.



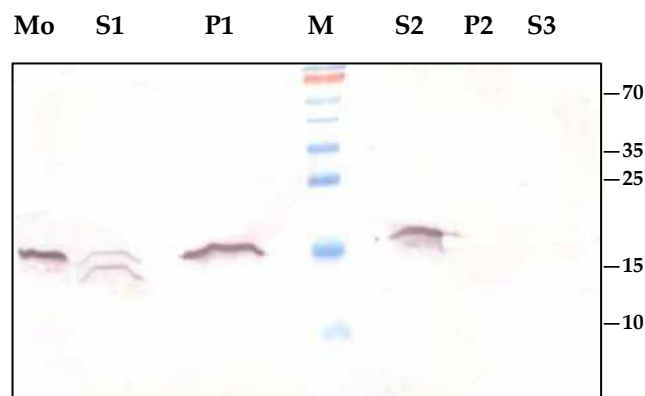
**Figura 11:** Expresión del fragmento Us3F2 a distintos tiempos post inducción (indicado en minutos). C+: proteína recombinante no relacionada expresada en sistema pRSET/ *Rosetta Gami 2*; M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), los valores indicados a la derecha se expresan en KDa. La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 19 kDa.

Además, se determinó que la proteína Us3F2 recombinante se encontraba en la fracción insoluble y se logró solubilizar con el tratamiento con urea 8M. Luego se realizó una extracción secuencial según el esquema detallado en la figura 12. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por *Western blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra el tracto de histidinas presentes en la proteína Us3F2 y se determinó que ésta se solubilizaba mayoritariamente en la fracción S2 (Fig. 12).

A

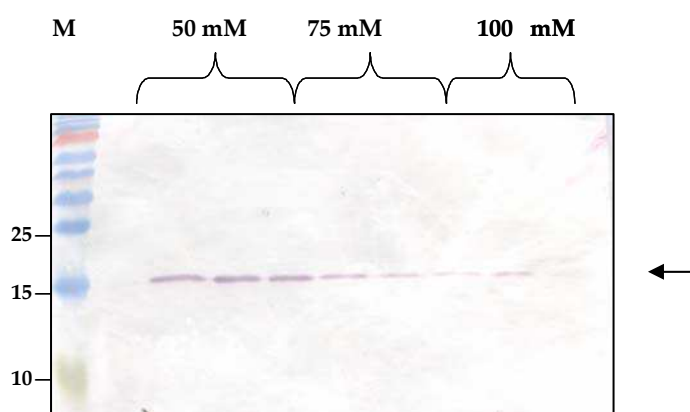


B



**Figura 12:** Semipurificación del fragmento Us3F2. **A:** Esquema de la extracción secuencial. **B:** Análisis por *Western blot* de las fracciones de la extracción secuencial utilizando un anticuerpo específico contra el tracto de histidinas M: Marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), los valores indicados a la derecha se expresan en KDa.

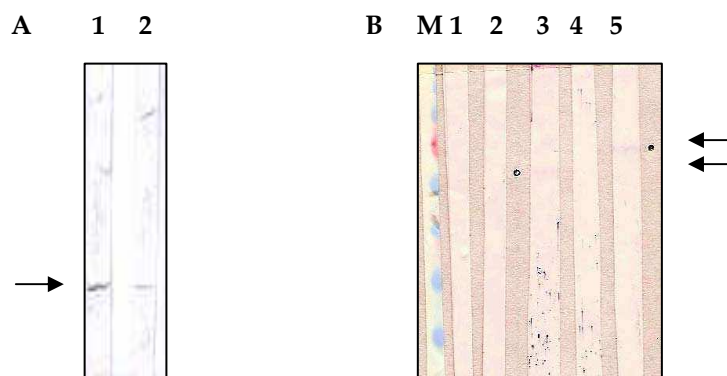
Luego, la fracción S2 fue purificada por columna de Ni-NTA. Se realizaron eluciones con concentraciones crecientes de histidina (50, 75, 100, 150 y 200 mM) y se determinó que la proteína Us3F2 eluía mayoritariamente a una concentración 50 mM de histidina (Fig. 13).



**Figura 13:** Purificación del fragmento Us3F2 por columna de Ni-NTA. Se muestran las calles correspondientes a la elución con 50, 75 y 100 mM de histidina. M: Marcador de peso molecular, los valores indicados a la izquierda se expresan en kDa. La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 19 kDa.

Luego, para obtener un suero policlonal específico contra la proteína Us3 se inocularon ratones BALB/c con la proteína Us3F2 según se detalla en la sección 15 de Materiales y Métodos.

La presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína Us3 en el suero de los ratones fue analizada por *Western blot* contra el fragmento Us3F2 purificado y contra un extracto proteico obtenido a partir de células MDBK infectadas con BoHV-5 (Fig. 14). Además, se evaluó la reactividad de éste suero mediante la técnica de inmunocitoquímica sobre células MDBK infectadas con BoHV-5 (Fig. 15). Los resultados obtenidos indican que se obtuvo un suero específico dirigido contra la proteína Us3 de BoHV-5 (cepa A663).



**Figura 14:** Análisis por *Western blot* de los sueros anti Us3 de los ratones inmunizados con el fragmento Us3F2 purificado a partir de bacterias. **A:** frente a Us3F2 purificado (calle 1: suero anti Us3F2 1/50 y calle 2 suero anti Us3F2 1/100). **B:** frente a células MDBK infectadas con BoHV-5 (calle 1 y 2: MDBK sin infectar, suero anti Us3F2 1/50 y 1/100, respectivamente; calles 3 y 4 MDBK infectadas con BoHV-5, suero anti Us3F2 1/50 y 1/100, respectivamente y calle 5: MDBK infectadas con BoHV-5, suero anti gD 1/100). Las flechas indican los productos esperados de aproximadamente 19 kDa (A, calle 1 y 2), 48 KDa (B, calle 3) y 70 KDa (B, calle 5).



**Figura 15:** Inmucitoquímica sobre células MDBK infectadas con BoHV-5. **A:** células MDBK sin infectar. **B:** células MDBK infectadas con BoHV-5 a MOI 0,01 (24 hpi). **C:** células MDBK infectadas con BoHV-5 a MOI 1 (16 hpi). Se muestran los resultados obtenidos utilizando el suero anti-Us3F2 en una dilución 1:100. Las células positivas presentan coloración marrón intensa. **A y B:** Aumento 40x. **C:** Aumento 100x.

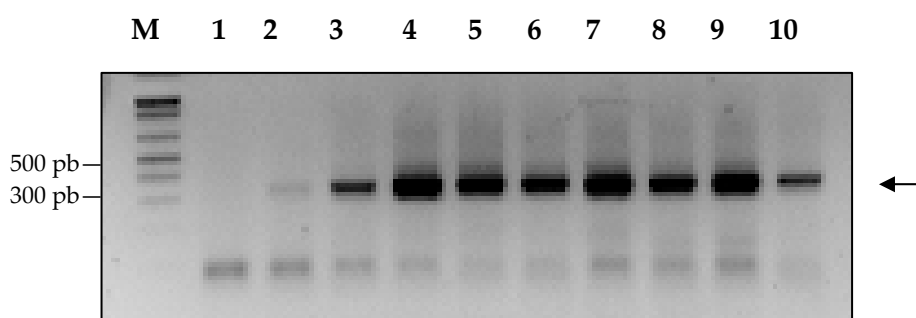
### 2.3 Expresión del gen *us3* durante la replicación de BoHV-5

Con el fin de conocer la cinética de expresión de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 se infectaron monocapas de células MDBK y se realizó un análisis a nivel transcripcional y proteico a distintos tiempos post infección.



Se evaluó mediante RT-PCR la expresión a nivel transcripcional (ARN mensajero) del gen codificante para Us3 utilizando ARN total purificado que fue extraído a partir de células MDBK infectadas con BoHV-5 durante distintos tiempos (0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 20; y 24 hpi). Previo a la amplificación específica del gen *us3* se realizó la amplificación del gen *gapdh*, de expresión constitutiva en las células MDBK, para confirmar la presencia de ADN copia en todas las muestras a analizar.

Los resultados obtenidos al realizar la amplificación específica del gen *us3* confirmaron que este gen se transcribe durante la infección con la cepa A663 de BoHV-5 y de manera temprana, ya que se detecta a los 30 minutos post infección (Fig. 16). También se observó que la transcripción del gen *us3* fue prolongada en el tiempo, detectándose desde los 30 minutos hasta las 24 hpi (Fig. 16).

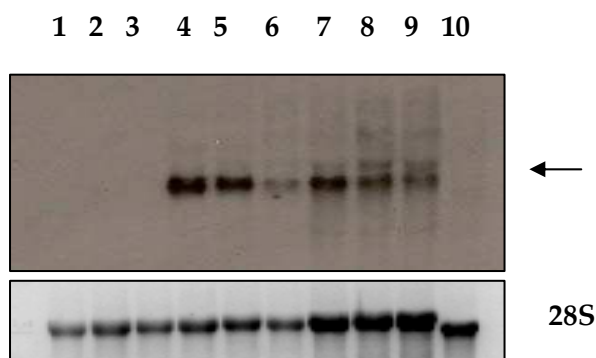


**Figura 16:** Expresión del ARN mensajero del gen *us3*. Visualización de los productos de amplificación por RT-PCR resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Se utilizaron los oligonucleótidos Us3F1-F y Us3F1-R que amplifican un fragmento interno del gen *us3* de 336 pb. Calle 1: ADN copia obtenido a partir de células sin infectar (control -), calles 2-10: ADN copia obtenido a partir de células infectadas con BoHV-5 a 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 20 y 24 hpi, respectivamente.

Para confirmar que la amplificación específica observada por PCR se debiera a la presencia de ADN copia y no de ADN genómico viral, se realizó la reacción de amplificación por PCR para Us3 utilizando como templado el ARN extraído. En ninguno de los casos se observó banda de amplificación, confirmando el resultado de la RT-PCR específica para Us3.

Posteriormente se realizó un ensayo de *Northern Blot* a partir de ARN total extraído de células MDBK infectadas con BoHV-5 durante distintos tiempos para analizar la presencia de transcritos del gen *us3*. Se utilizó como sonda un fragmento interno del gen *us3* de 336 nt comprendido entre las posiciones 81-417.

Se detectó una banda reactiva correspondiente a un ARN mensajero de aproximadamente 2500 nt a partir de las 2 hpi y hasta las 20 hpi (Fig. 17). En base a la relación de intensidad del ARN ribosomal 28S y las bandas reactivas Us3 específicas se observa que la expresión del transcripto del gen *us3* es máxima entre las 2 y 4 hpi (Fig. 17, calles 4 y 5, respectivamente), en concordancia con lo reportado para la expresión de genes tempranos en el ciclo de replicación de los alfa herpesvirus.

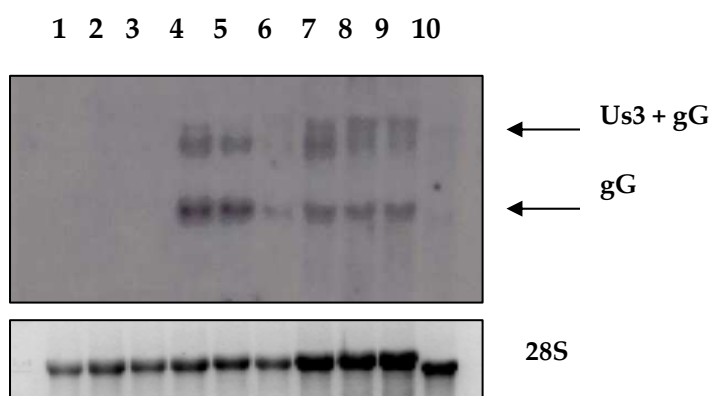


**Figura 17:** Evaluación de la expresión del gen *us3* a distintos tiempos post infección. Panel superior, autorradiografía del ensayo de *Northern blot*. Panel inferior, ARN ribosomal 28S teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Calle 1: ARN mensajero obtenido a partir de células sin infectar (control –), calles 2-10: ARN mensajero obtenido a partir de células infectadas con BoHV-5 a 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 20 y 24 hpi, respectivamente. Se utilizó como sonda un fragmento interno del gen *us3*.

En los alfa herpesvirus PrV y HSV-1 la señal de poliadenilación del ARN mensajero codificado por el gen *us3* se encuentra río abajo del gen *gG* (*us4*), expresándose un ARN mensajero bicistrónico codificante para las proteínas Us3 y gG. Además se expresa un ARN mensajero monocistrónico codificante para gG. Con el fin de estudiar este aspecto de la expresión del gen *us3* en BoHV-5, la membrana de nylon utilizada para el ensayo de *Northern blot* descrito previamente fue re-hibridada con una sonda correspondiente al gen *gG* de

BoHV-5. Este gen fue amplificado por PCR utilizando como templado ADN viral de la cepa A663 y fue secuenciado con el fin de confirmar su identidad.

En la figura 18 se observa la presencia de dos bandas reactivas, la de menor tamaño (aproximadamente 1100 nt) correspondería al ARN mensajero monocistrónico codificante para la proteína gG mientras que la de mayor tamaño correspondería al ARN mensajero bicistrónico, codificante para ambas proteínas (2500 nt). La superposición de las autorradiografías obtenidas al hibridar la membrana de nylon con las sondas correspondientes a la fracción interna del gen *us3* y al gen *gG* permitió confirmar la expresión bicistrónica de estos genes.



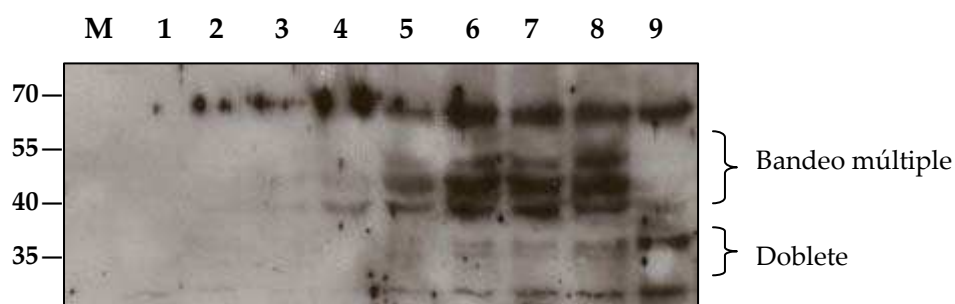
**Figura 18:** Evaluación de la expresión bicistrónica del gen *us3* a distintos tiempos post infección. Panel superior, autorradiografía del ensayo de *Northern blot*. Panel inferior, ARN ribosomal 28S teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Calle 1: ARN mensajero obtenido a partir de células sin infectar (control –), calles 2-10: ARN mensajero obtenido a partir de células infectadas con BoHV-5 a 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 20 y 24 hpi, respectivamente. Se utilizó como sonda el gen *gG* completo de BoHV-5.

Los resultados obtenidos por la técnica de *Northern Blot* indicarían la presencia de un único ARN mensajero para Us3. Este ARN mensajero se expresaría en forma más abundante en las primeras horas del ciclo de replicación de BoHV-5 y su expresión iría disminuyendo hacia el final del mismo. Además, fue posible determinar la expresión bicistrónica de los genes *us3* y *gG*.

Luego se evaluó la expresión de la proteína Us3 en células MDBK infectadas con BoHV-5 a distintos tiempos post infección. Los extractos proteicos fueron resueltos por SDS-

PAGE 10% y analizados por *Western blot* utilizando como anticuerpo primario el suero de ratón dirigido contra la proteína Us3F2.

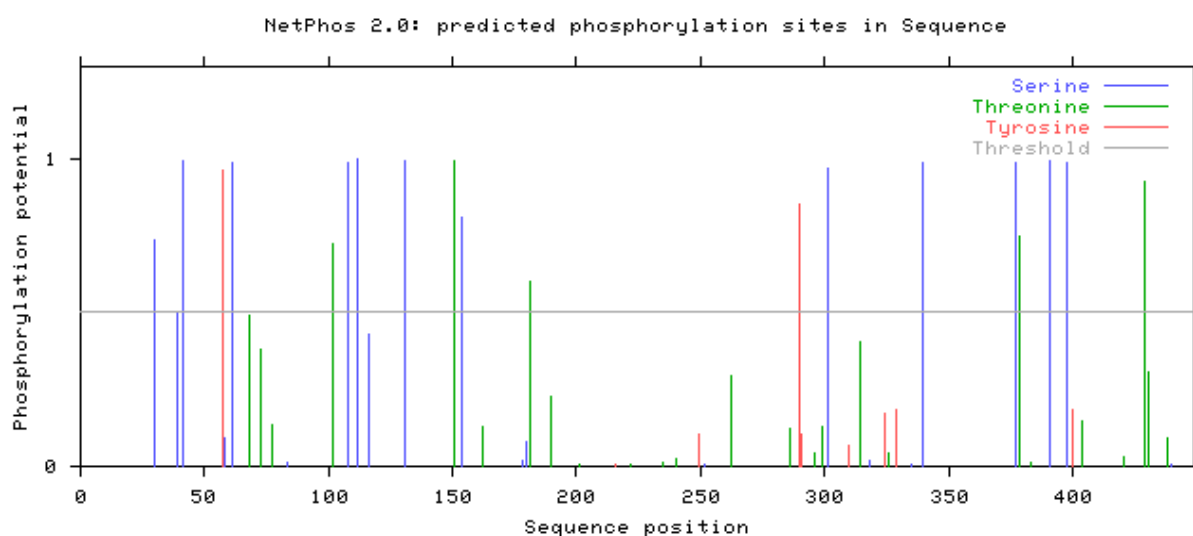
En la figura 19 se observa que la expresión de la proteína Us3 se detecta tempranamente, a partir de las 2 hpi y que continúa detectándose hasta las 48 hpi. También se observó un bandeo específico múltiple que podría deberse a modificaciones post traduccionales de la proteína Us3. Asimismo, la presencia de un doblete de aproximadamente 35 KDa sugiere la posibilidad de una isoforma de menor peso molecular, de manera similar a lo que sucede con las proteínas Us3 de HSV y PrV. Esta isoforma podría deberse a la presencia de un sitio interno de iniciación de la traducción. En este sentido, la segunda metionina presente en la secuencia lineal de la proteína Us3 se encuentra en la posición aminoacídica 186 y de iniciarse a partir de allí la traducción se generaría un producto de aproximadamente 30 KDa, en concordancia con lo observado.



**Figura 19:** Cinética de expresión de la proteína Us3. *Western blot* sobre extractos proteicos de células infectadas con BoHV-5 a distintos tiempos. Se utilizó como anticuerpo primario el suero anti Us3F2 de ratón. Calle 1: células MDBK sin infectar. Calles 2 a 9: 2; 4; 6; 8; 16; 20; 24 y 48 hpi, respectivamente. M: Marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), los valores indicados se expresan en KDa.

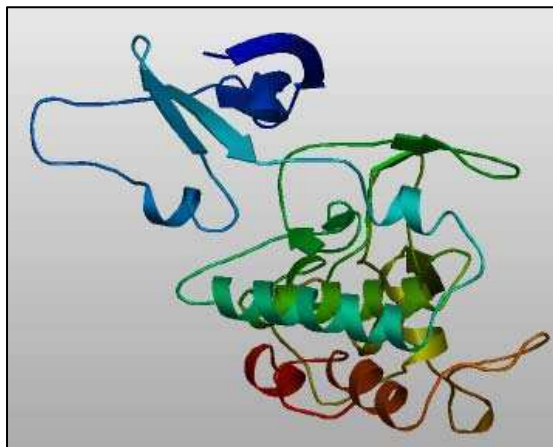
Con el fin de interpretar el bandeo múltiple recién mencionado para la proteína Us3 en los ensayos de *Western blot* se analizó *in silico* la presencia de putativos sitios de fosforilación y dominios de dimerización en la secuencia aminoacídica de la proteína Us3.

La predicción de sitios de fosforilación en la secuencia aminoacídica de la proteína Us3 se realizó con la consulta NetPhos 2. Esta herramienta bioinformática predijo la fosforilación de 12 serinas, 5 treoninas y 2 tirosinas presentes en la proteína Us3. En el Anexo III se detalla la posición aminoacídica de las serinas, treoninas y tirosinas mencionadas y su probabilidad de fosforilación. En la figura 20 se muestra el potencial de fosforilación de la proteína Us3.



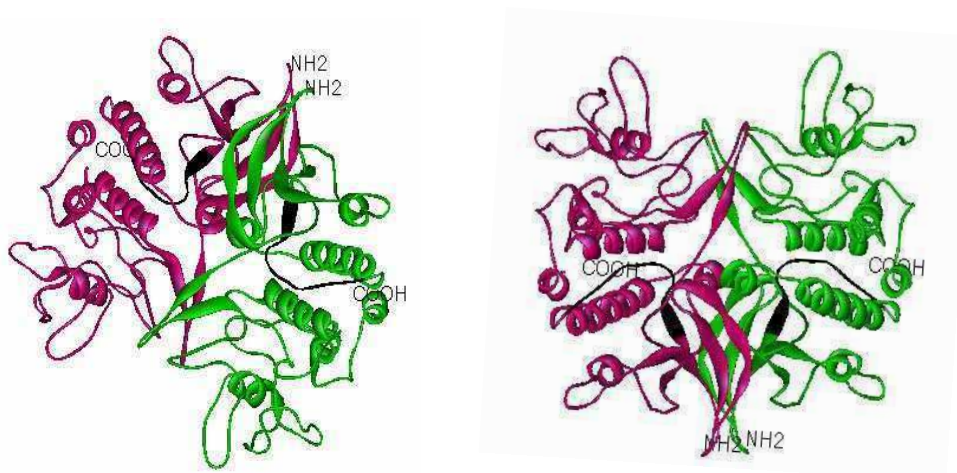
**Figura 20:** Predicción del potencial de fosforilación de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5.

Por otra parte, para predecir la presencia de dominios de dimerización en la secuencia aminoacídica de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 se obtuvo en primer lugar la estructura terciaria de dicha proteína por homología de secuencias. Debido a que hasta el momento no ha sido cristalizada la proteína Us3 de ningún alphaherpesvirus, el modelado de la proteína Us3 de la cepa A663 comprendió desde el aminoácido 143 hasta el 438, región que corresponde al dominio de proteína quinasa para el cual existe información cristalográfica disponible (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; dominio Pfam 00069). En la figura 21 se observa el resultado obtenido y se visualizan las estructuras secundarias predichas.



**Figura 21:** Predicción de la estructura terciaria de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5. Las láminas  $\beta$  y las  $\alpha$ -hélices están indicadas por flechas planas y hélices, respectivamente.

Luego se predijo *in silico* la formación de homodímeros de la proteína Us3 utilizando la herramienta *Symmdock*. Se analizaron los resultados más probables (con mejor *score*) y se observó que la proteína Us3 tendría la capacidad de dimerizarse a través de una  $\alpha$ -hélice y una zona de enlace entre dos  $\alpha$ -hélices sin estructura definida. En la formación de este dímero se observó que el sitio activo de la proteína Us3 no se encuentra impedido estéricamente ni comprometido en la interacción entre ambos monómeros, quedando disponible para llevar a cabo su actividad catalítica. Esto sugiere que tal conformación podría ser adoptada en la célula. En la figura 22 se observa una de las interacciones mencionadas.



**Figura 22:** Formación de homodímeros de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5. Una de las dos moléculas de Us3 en el homodímero se identifica con color rojo y la otra con color verde. En ambas moléculas se identifica con negro el sitio activo. NH<sub>2</sub> y COOH indican los extremos amino y carboxilo, respectivamente. Se muestran dos vistas diferentes de la interacción más probable.

El análisis de la expresión de la proteína Us3 en células MDBK infectadas con BoHV-5 mostró que esta proteína se expresa temprana y prolongadamente durante el ciclo de replicación viral. Además, se observó un bandeo específico múltiple que podría deberse a la formación de homodímeros, a distintos estados de fosforilación de la proteína Us3 o a otras modificaciones post traduccionales. También se observó la presencia de un doblete de menor peso molecular que podría corresponder a una isoforma de la proteína Us3.

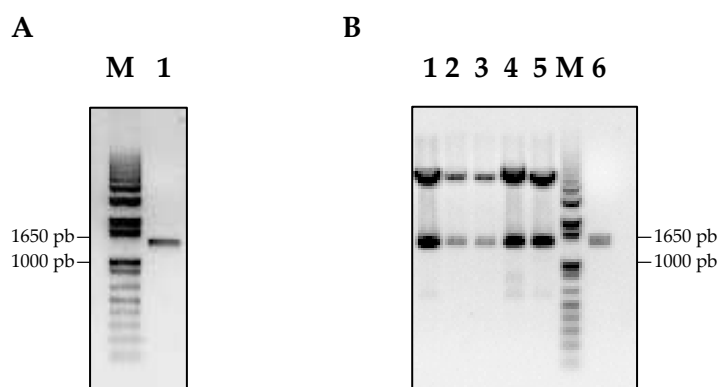
#### 2.4. Estudio de las modificaciones inducidas por la proteína Us3 de BoHV-5 sobre el citoesqueleto

Con el fin de estudiar la función de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 en células eucariotas, ésta fue fusionada a la proteína ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*).

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos denominados EcoRI-Us3f-F y BamHI-Us3f-R para amplificar el gen codificante para Us3 y clonarlo en el plásmido de expresión eucariota pECFP-N1, río arriba y en marco de lectura continuo con la secuencia nucleotídica

codificante para ECFP. La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando como templado ADN genómico viral y un programa de ciclado del tipo *touch-down*. Las condiciones finales de reacción se describen en la sección 9.1 de Materiales y Métodos y los programas de ciclado en el Anexo II (Condiciones de reacción y ciclado de PCR).

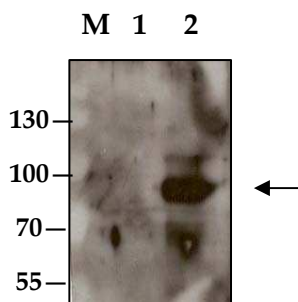
El producto de amplificación obtenido, denominado Us3f (de 1348 nt), fue clonado en el vector pGEM-T *easy*, obteniéndose el plásmido pGEM-Us3f el cual fue secuenciado. A partir de este plásmido se realizó el subclonado de Us3f en el vector pECFP-N1, obteniéndose así el plásmido pECFP-Us3 (Fig. 23). Este clonado se realizó de forma direccionada, utilizando las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. La correcta inserción del producto de PCR fue confirmada por secuenciación.



**Figura 23:** A: Amplificación por PCR del producto Us3f (calle 1). B: Productos de la digestión enzimática del plásmido pECFP-Us3f con las enzimas EcoRI y BamHI (calles 1 a 5, corresponden a distintos clones). Fragmento Us3f (calle 6). A y B fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus Invitrogen).

La expresión de la proteína de fusión Us3-ECFP en células BHK-21 transfectadas transitoriamente con el plásmido pECFP-Us3 fue analizada por *Western blot* (Fig. 24).

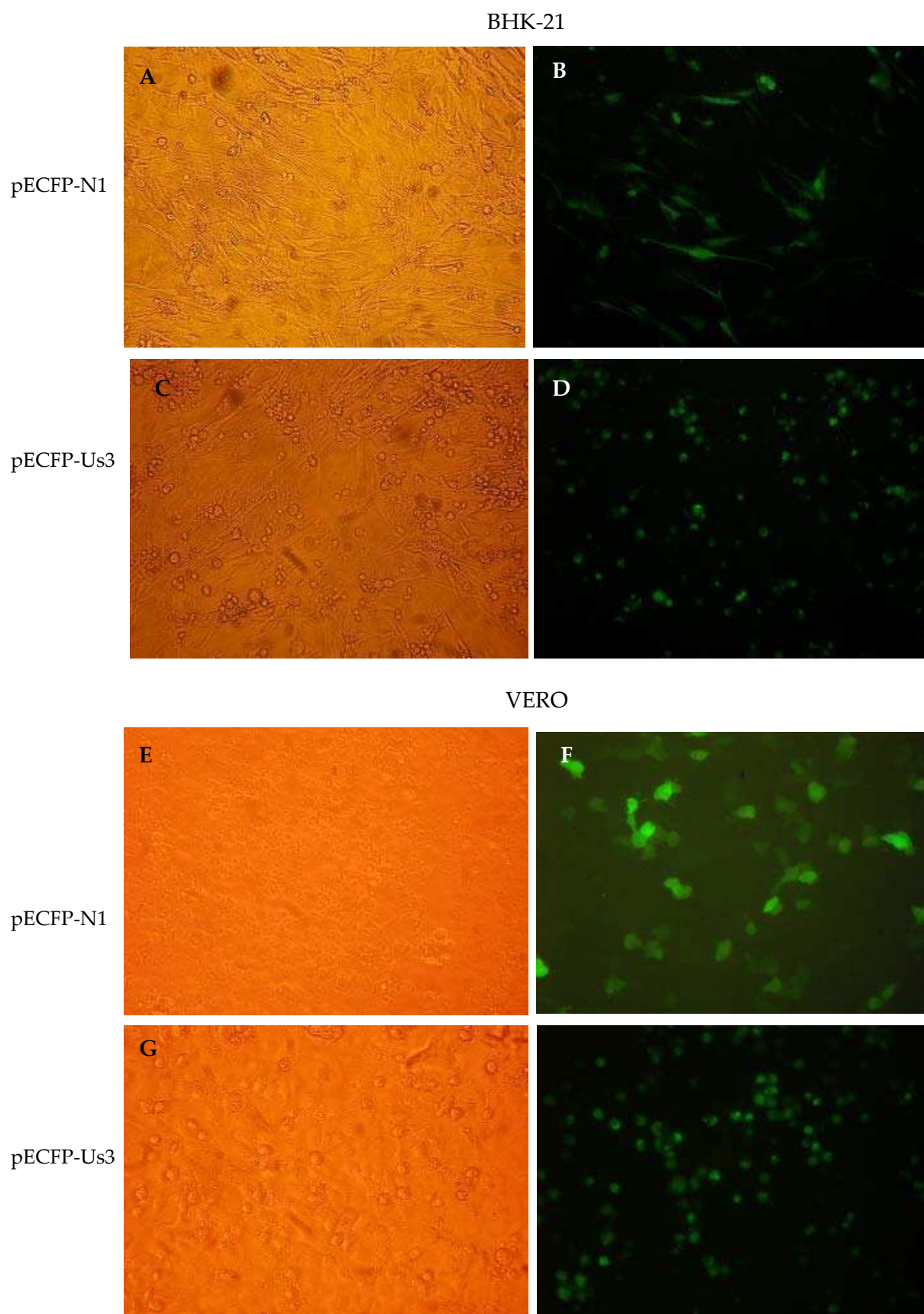




**Figura 24:** Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína de fusión Us3-ECFP en células BHK-21 transitoriamente transfectadas con pECFP-N1 (calle 1) y pECFP-Us3 (calle 2). Como anticuerpo primario se utilizó el suero policlonal de ratón específico dirigido contra la proteína Us3F2. M: Marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), los valores indicados a la izquierda se expresan en kDa. La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 76 kDa.

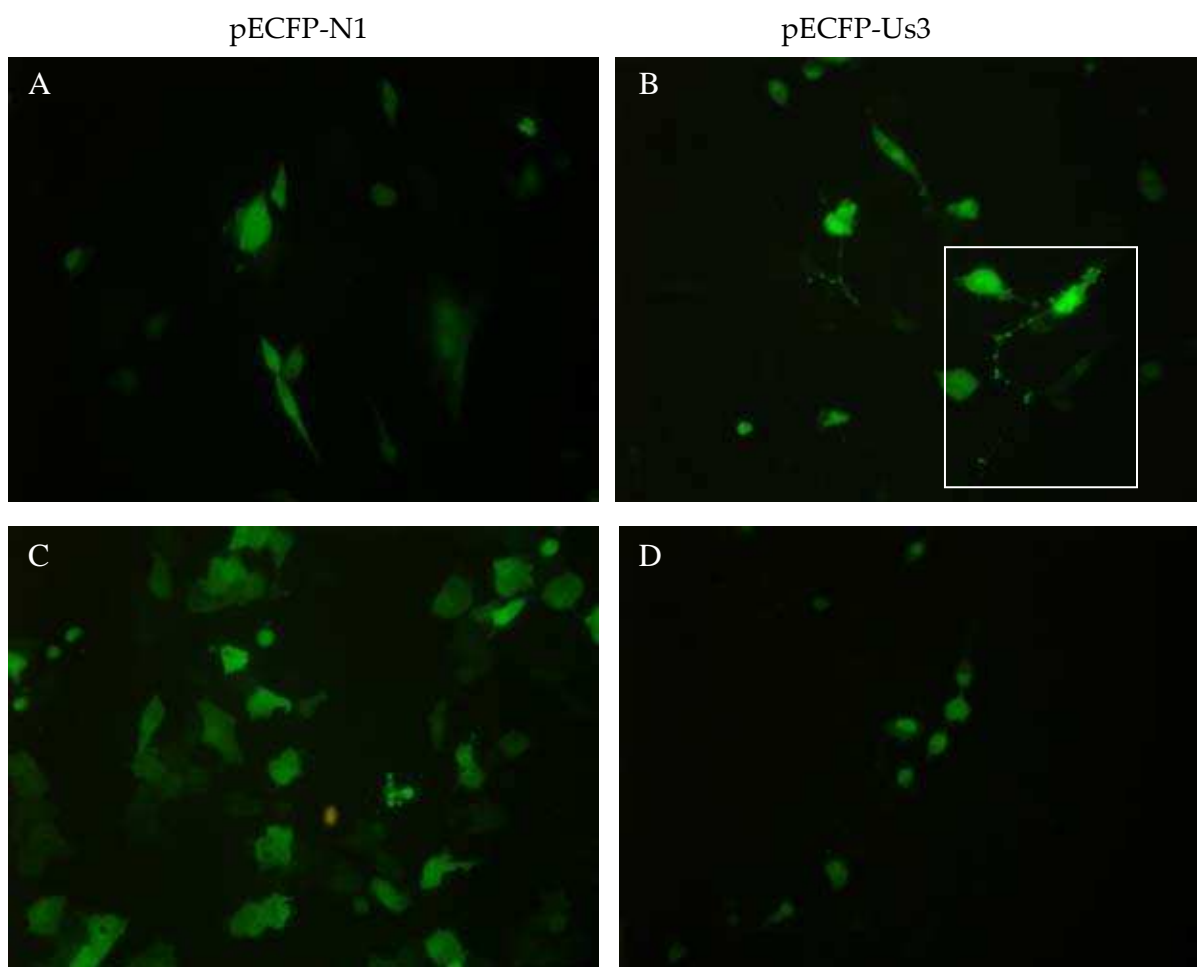
Con el fin de evaluar los efectos de la proteína Us3 sobre la morfología celular se realizaron transfecciones transitorias con los plásmido pECFP-Us3 y pECFP-N1 en células BHK-21 y VERO y se evaluó la expresión de la proteína de fusión mediante la visualización de las monocapas transfectadas al microscopio de fluorescencia.

La expresión de la proteína Us3-ECFP se detectó a partir de las 16 horas post transfección (hpt) y fue máxima a las 48 hpt. En las dos líneas celulares utilizadas se observó que sólo las células transfectadas con pECFP-Us3 presentaban redondeamiento, característica indicadora de alteraciones en el citoesqueleto (Fig. 25). Además, se observó un patrón de distribución subcelular diferente en las células transfectadas con el plásmido pECFP-Us3 respecto del plásmido control pECFP-N1. La proteína ECFP presentó una distribución uniforme en las células transfectadas, mientras que la proteína Us3-ECFP se localizó en acúmulos discretos, sugiriendo que la proteína Us3 tendría señales específicas de localización subcelular (Fig. 25).

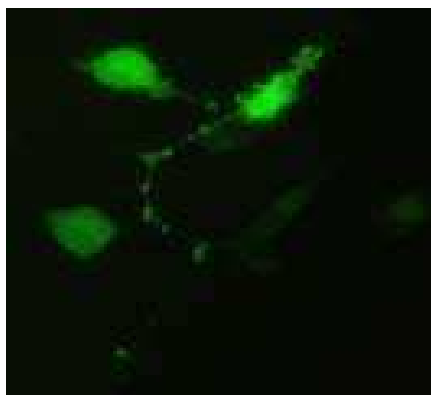


**Figura 25:** Transfecciones transitorias en las líneas celulares BHK-21 (A-D) y VERO (E-H) con los plásmido pECFP-N1 (A, B, E y F) y pECFP-Us3 (C, D, G y H). Aumento: 100x.

Luego se realizaron co-transfecciones transitorias en células BHK-21 y VERO con los plásmidos pECFP-N1 + pTrip y pECFP-Us3 + pTtrip. El plásmido pTrip codifica para la proteína GFP, que se distribuye uniformemente dentro de la célula. A las 24 hpt las monocapas transfectadas fueron observadas al microscopio de fluorescencia. En ambas líneas celulares se observó que las células co-transfectadas con pECFP-Us3 + pTtrip presentaban prolongaciones que se extendían hacia células vecinas (Fig. 26 y 27). Estas prolongaciones, de longitud variable, presentaban fluorescencia verde intensa, mientras que las células que ellas contactaban presentaban fluorescencia verde más tenue, sugiriendo que la proteína GFP podría estar transportándose a través de dichas prolongaciones. En las células co-transfectadas con pECFP-N1 + pTrip no se observó la formación de prolongaciones, indicando que la formación de las mismas es inducida por la proteína Us3 (Fig. 26).



**Figura 26:** Co-transfecciones transitorias en las líneas celulares BHK-21 (A y B) y VERO (C y D) con los plásmidos pECFP-N1 + pTrip (A y C) y pECFP-Us3 + pTrip (B y D). Aumento: 100x.



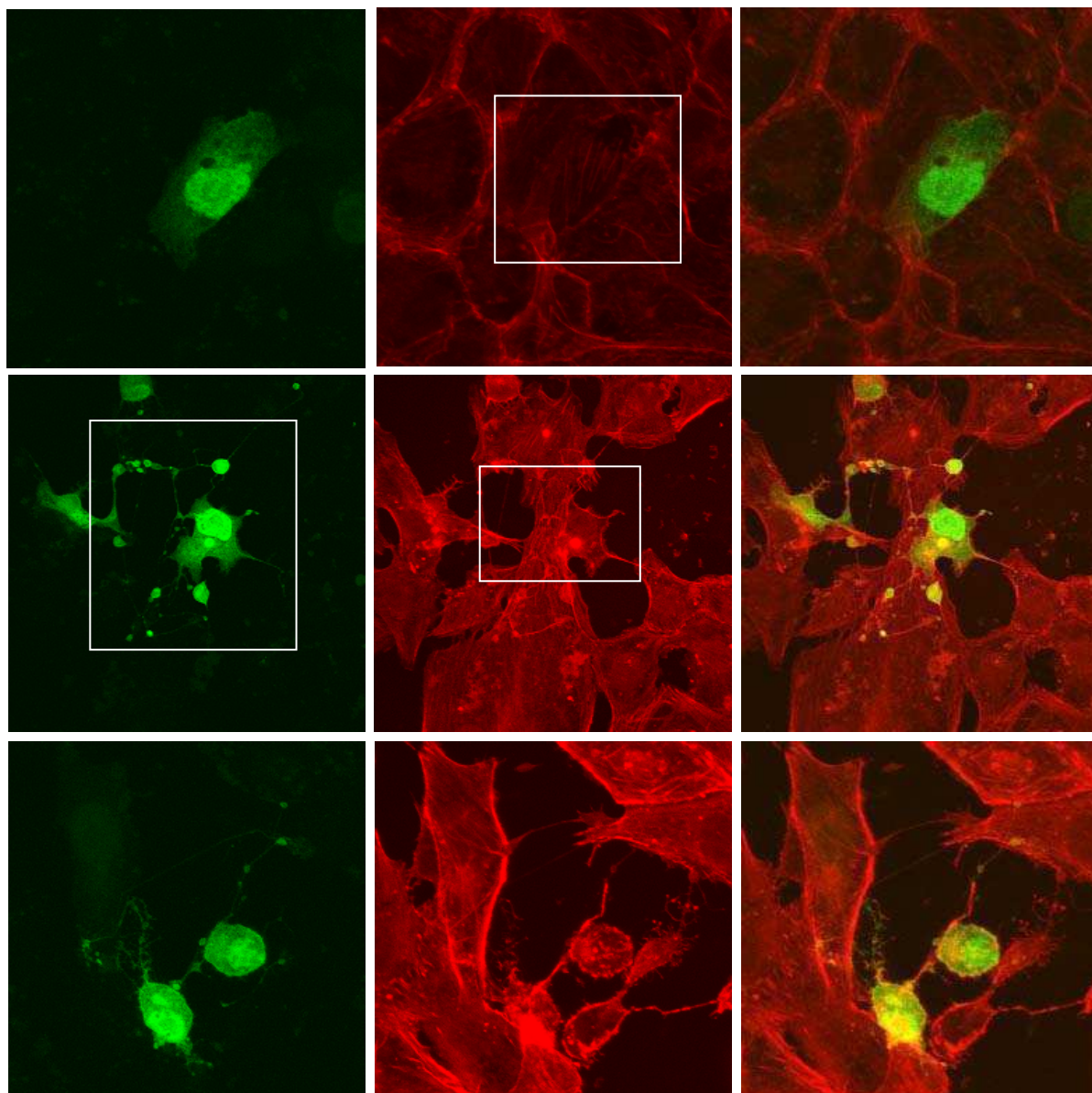
**Figura 27:** Ampliación del recuadro realizado en la figura 26 B en donde se visualizan con mayor claridad las prolongaciones emitidas por las células transfectadas con los plásmidos pECFP-Us3 + pTrip.

Posteriormente, se analizó el efecto de la proteína Us3 de BoHV-5 sobre el citoesqueleto de actina. Para ello se realizaron co-transfecciones transitorias en células VERO y BHK-21 con los plásmidos pECFP-N1 + pTrip y pECFP-Us3 + pTrip. A las 24 hpi las células fueron fijadas y el citoesqueleto de actina fue marcado por agregado de faloidina conjugada con *Texas Red*, y se visualizó al microscopio confocal.

Como se muestra en las figuras 28; 29; 30 y 31, en las células co-transfectadas con pECFP-N1 + pTrip no se observaron alteraciones morfológicas. En cambio, las células co-transfectadas con pECFP-Us3 + pTrip presentaron prolongaciones largas y delgadas que culminaban en células vecinas (Fig. 28-31). Estos resultados indicarían que las prolongaciones observadas serían causadas por la expresión de la proteína Us3.

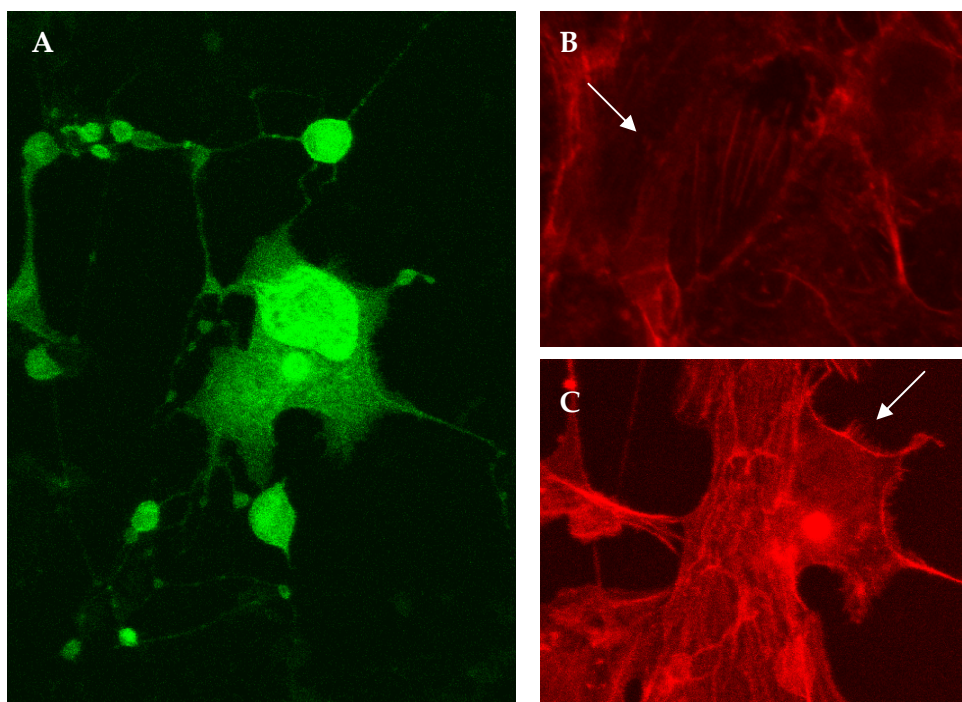
Al visualizar el citoesqueleto de actina se observó que las células co-transfectadas con pECFP-N1 + pTrip no presentaban alteraciones morfológicas. A diferencia de esto, se observó pérdida de las fibras de estrés en las células co-transfectadas con pECFP-Us3 + pTrip (Fig. 28-31). Estos resultados indicarían que la expresión de la proteína Us3 induce el desensamblado del citoesqueleto de actina.

Además, debido a la coloración roja que presentaron las células co-transfectadas con pECFP-Us3 + pTrip, se determinó que las proyecciones emitidas contenían actina (Fig. 28, panel inferior y Fig. 30, panel medio).

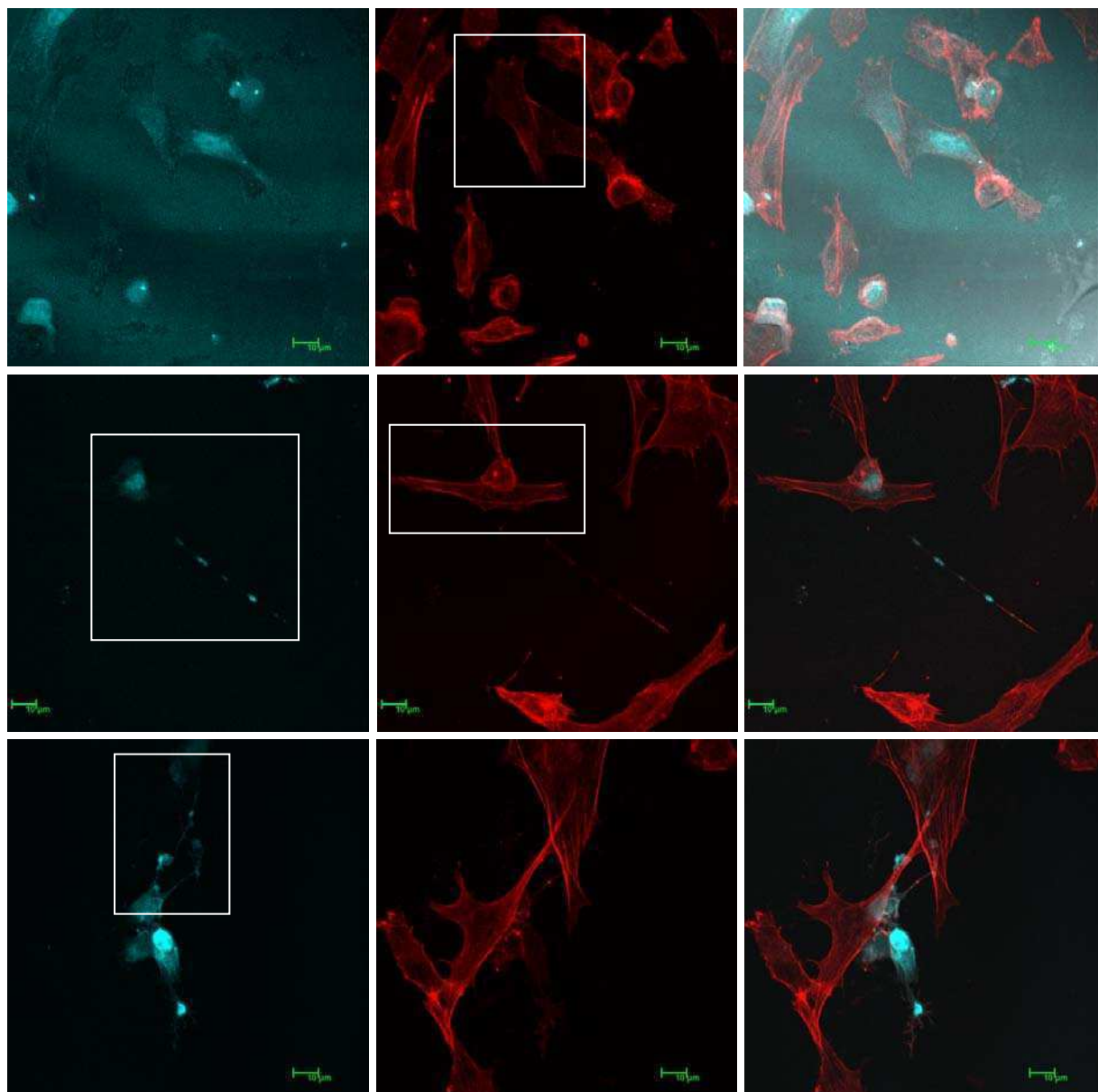


**Figura 28:** Co-transfecciones transitorias de los plásmidos pECFP-N1 + pTrip (panel superior) y pECFP-Us3 + pTrip (panel medio e inferior) en células VERO. La fluorescencia verde corresponde a las células co-transfectadas (primer columna) y la roja al citoesqueleto de actina (segunda columna). En la tercer columna se observa la superposición de ambas fluorescencias. Aumento: 200x.

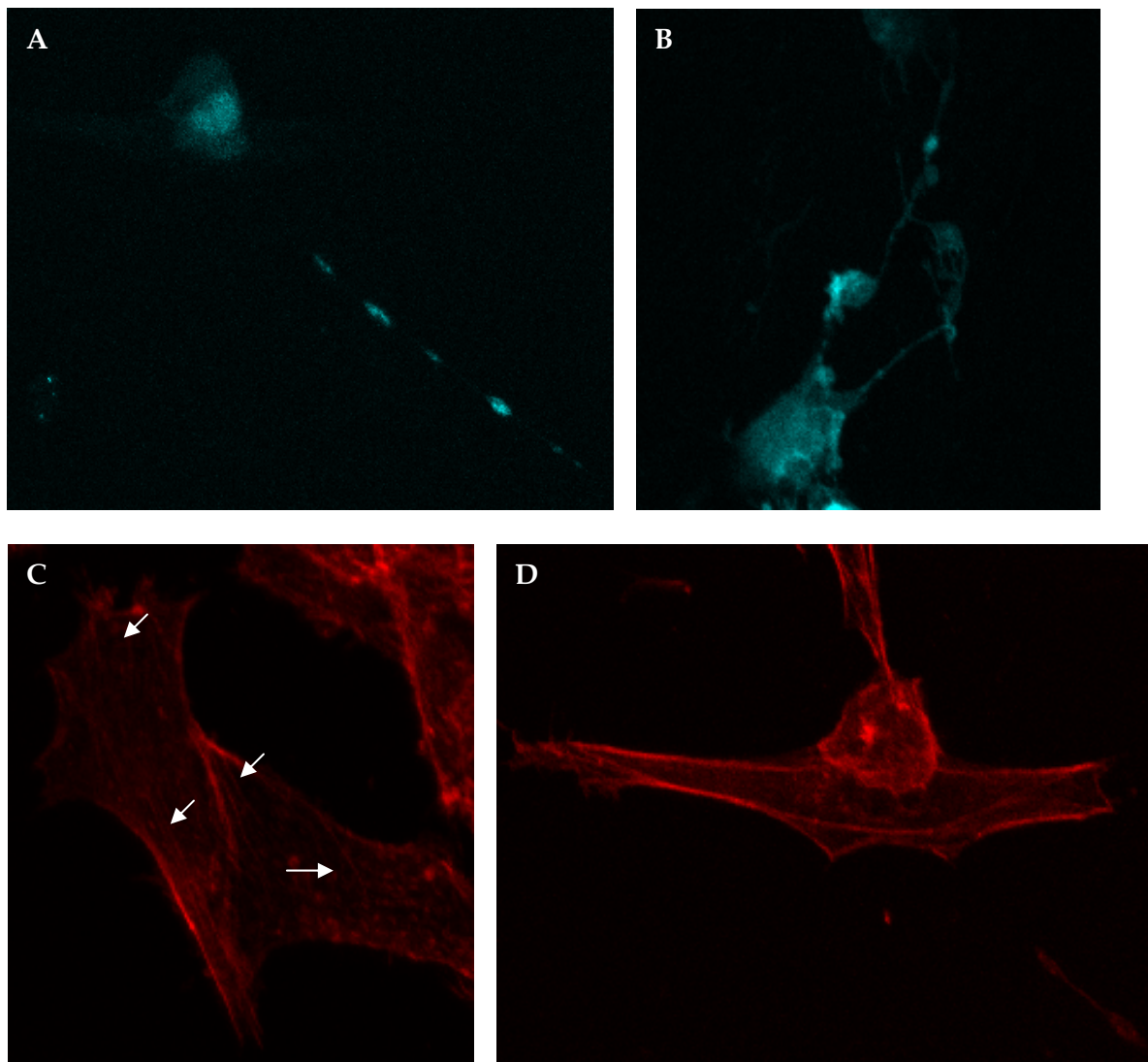




**Figura 29:** Ampliación de los recuadros realizados en la figura 28 en donde se visualizan con mayor claridad las prolongaciones emitidas por las células VERO transfectadas con los plásmidos pTrip + pECFP-Us3 (A), las fibras de estrés en una célula VERO (señalada por la flecha) transfectada con los plásmidos control pECFP-N1 + pTrip (B) y la ausencia de fibras de estrés en una célula VERO (señalada por la flecha) transfectada con los plásmidos pECFP-Us3 + pTrip (C).



**Figura 30:** Co-transfecciones transitorias de los plásmidos pECFP-N1 + pTrip (panel superior) y pECFP-Us3 + pTrip (panel medio e inferior) en células BHK-21. La fluorescencia celeste corresponde a las células co-transfectadas y la roja al citoesqueleto de actina. En la tercer columna se observa la superposición de ambas fluorescencias. Aumento: 200x.



**Figura 31:** Ampliación de los recuadros realizados en la figura 30 en donde se visualizan con mayor claridad las prolongaciones emitidas por células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pTrip + pECFP-Us3 (A y B), las fibras de estrés (señaladas por flechas) en células BHK-21 transfectadas con los plásmidos control pECFP-N1 + pTrip (C) y la ausencia de fibras de estrés en células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pECFP-Us3 + pTrip (D).

## **2.5. Evaluación de la relevancia de la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 en los efectos de esta proteína sobre el citoesqueleto de actina.**

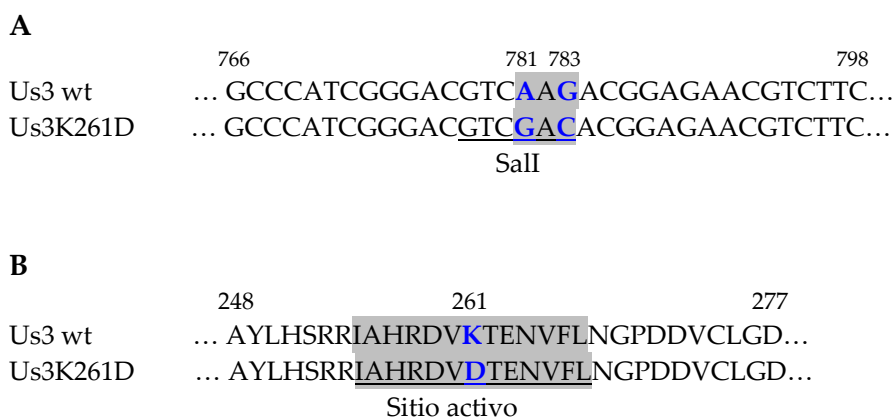
Para determinar si la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 se encuentra implicada en las alteraciones del citoesqueleto observadas en los experimentos de



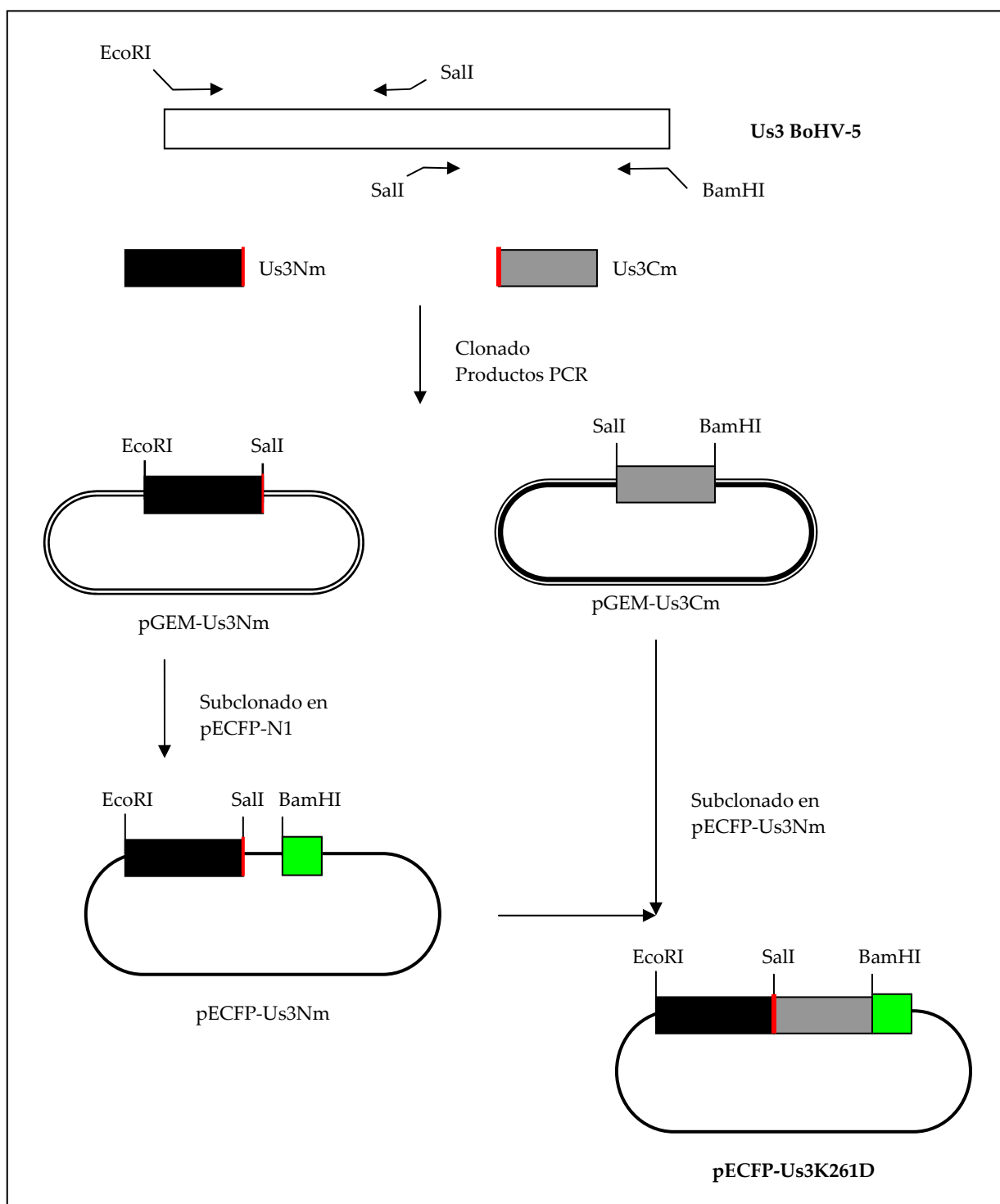
transfección, se realizaron estudios similares a los descriptos anteriormente pero con una versión de la proteína Us3 que tenía mutado el sitio activo de quinasa.

Ha sido reportado para los alfa herpesvirus MDV y BoHV-1 que la sustitución de la lisina (K) presente en el sitio activo de quinasa de la proteína Us3 lleva a la pérdida de su función enzimática (Labiuk *et al.*, 2009b; Schumacher *et al.*, 2008). En base a esto, se sustituyeron los nucleótidos codificantes para la lisina correspondiente a la posición aminoacídica 261, perteneciente al sitio activo de la proteína Us3 de BoHV-5, mediante mutagénesis dirigida por PCR. El aminoácido lisina fue reemplazado por ácido glutámico (D) y la proteína mutada se denominó Us3K261D.

A continuación se detallan las mutaciones a nivel nucleotídico introducidas por PCR que codifican para la proteína Us3K261D (Fig. 32) y un esquema de la estrategia de clonado secuencial utilizada para la obtención del plásmido pECFP-Us3K261D (Fig. 33).

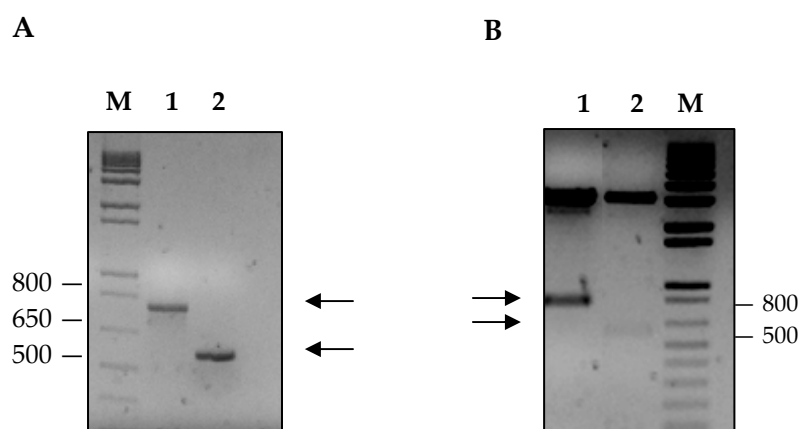


**Figura 32:** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas comprendidas entre las posiciones 776 y 798 codificantes para las proteínas Us3 *wild type* (wt) y Us3K261D (**A**). En color azul se señalan los nucleótidos mutados (781 y 783) y en gris el codón codificante para K (Us3 wt) o D (Us3K261D). Subrayado se muestra el sitio Sall generado por mutagénesis dirigida. (**B**) Alineamiento de las secuencias proteicas comprendidas entre las posiciones aminoacídicas 248 y 277 de las proteínas Us3 *wild type* (wt) y Us3K261D. En gris se señala el sitio activo de proteína quinasa y en color azul se indica el aminoácido mutado.



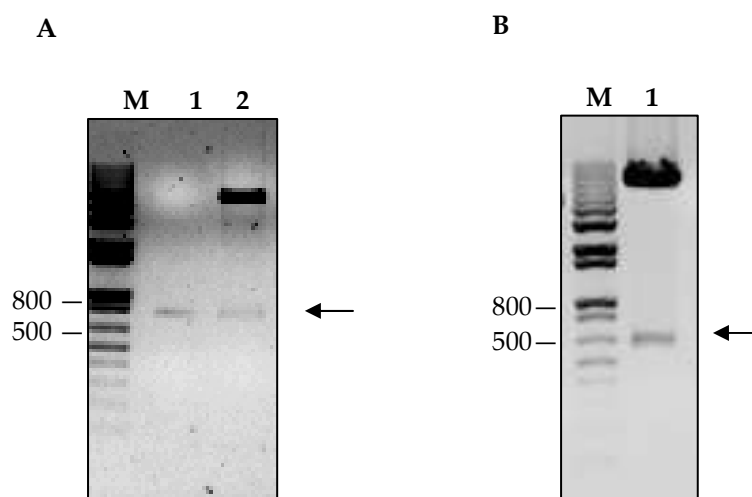
**Figura 33:** Esquema de la estrategia de clonado secuencial para la obtención del plásmido pECFP-Us3K261D. Los fragmentos Us3Nm y Us3Cm fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos que incorporan la mutación y clonados en vectores de clonado, obteniéndose los plásmidos pGEM-Us3Nm y pGEM-Us3Cm. Luego, el fragmento Us3Nm fue subclonado direccionalmente en el plásmido pECFP-N1 digerido con las enzimas EcoRI y SalI, obteniéndose el plásmido pECFP-Us3Nm. Finalmente, el fragmento Us3Cm fue subclonado direccionalmente en el plásmido pECFP-Nm con las enzimas SalI y BamHI, obteniéndose el plásmido pECFP-Us3K261D.

Como se detalla en la figura 34, el fragmento Us3Nm fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos EcoRI-Us3f-F y SalI-Us3m-R y el fragmento Us3Cm con los oligonucleótidos SalI-Us3m-F y BamHI-Us3f-R. Ambos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T *easy*, obteniéndose los plásmidos pGEM-Us3Nm y pGEM-Us3Cm (Fig. 34). La identidad de los fragmentos amplificados y la presencia de la mutación específica se corroboraron por secuenciación.



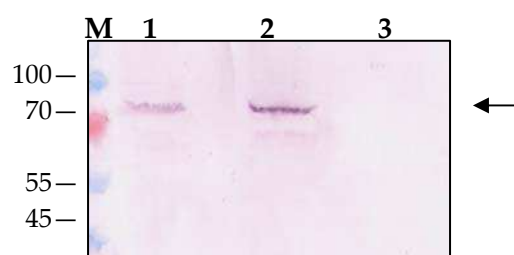
**Figura 34:** Amplificación por PCR de los fragmentos Us3Nm (calle 1, 789 pb) y Us3 Cm (calle 2, 563 pb) (A) y digestión enzimática con EcoRI de los plásmidos pGEM-Us3Nm y pGEMUs3Cm (B). Las flechas indican los fragmentos Us3Nm (calle 1) y Us3Cm (calle 2) liberados. A y B fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen), los valores están indicados en pb.

Luego se procedió al clonado secuencial de los fragmentos Us3Nm y Us3Cm en el plásmido pECFP-N1. En primer lugar se subclonó el fragmento Us3Nm a partir del plásmido pGEM-Us3Nm por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y SalI, obteniéndose el plásmido pECFP-Us3Nm (Fig. 35). Posteriormente se subclonó el fragmento Us3Cm a partir del plásmido pGEM-Us3Cm en el plásmido pECFP-Us3Nm por digestión con las enzimas de restricción SalI y BamHI (Fig. 35). La correcta inserción de ambos fragmentos y la presencia de la mutación generada fueron corroboradas por secuenciación. El plásmido obtenido se denominó pECFP-Us3K261D.



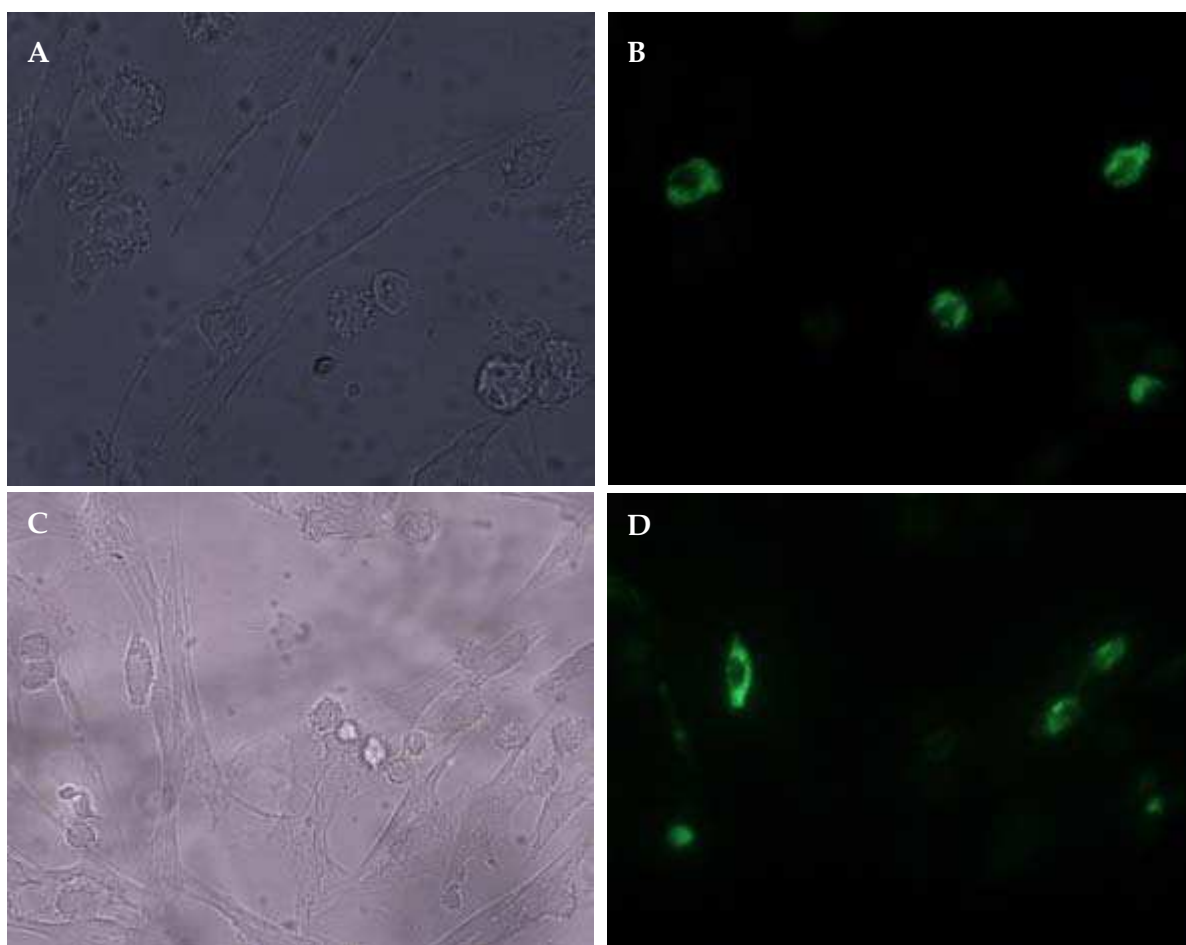
**Figura 35:** Clonado secuencial de los fragmentos Us3Nm y Us3Cm en el plásmido pECFP-N1. **A:** Digestión enzimática del plásmido pECFP-Us3Nm con EcoRI y SalI. La flecha indica el fragmento Us3Nm obtenido por digestión del plásmido pGEM-Us3Nm (calle 1) y la liberación del fragmento Us3Nm a partir de pECFP-Us3Nm (calle 2). **B:** Digestión enzimática del plásmido pECFP-Us3K261D con SalI y BamHI. La flecha indica el fragmento Us3Cm liberado a partir de pECFP-Us3K261D (calle 1). **A** y **B** fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen), los valores están indicados en pb.

La expresión de la proteína de fusión Us3K261D-ECFP en células BHK-21 transfectadas transitoriamente con el plásmido pECFP-Us3K261D fue analizada por *Western blot*, observándose una banda reactiva del tamaño esperado (76 kDa) (Fig. 36, calle 1).



**Figura 36:** Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína de fusión Us3K261D-ECFP en células BHK-21 transitoriamente transfectadas. Calle 1: pECFP-Us3K261D. Calle 2: pECFP-Us3. Calle 3: pECFP-N1. Como anticuerpo primario se utilizó el suero policlonal de ratón específico dirigido contra la proteína Us3F2. M: Marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), los valores indicados a la izquierda se expresan en kDa. La flecha indica el producto esperado de aproximadamente 76 kDa.

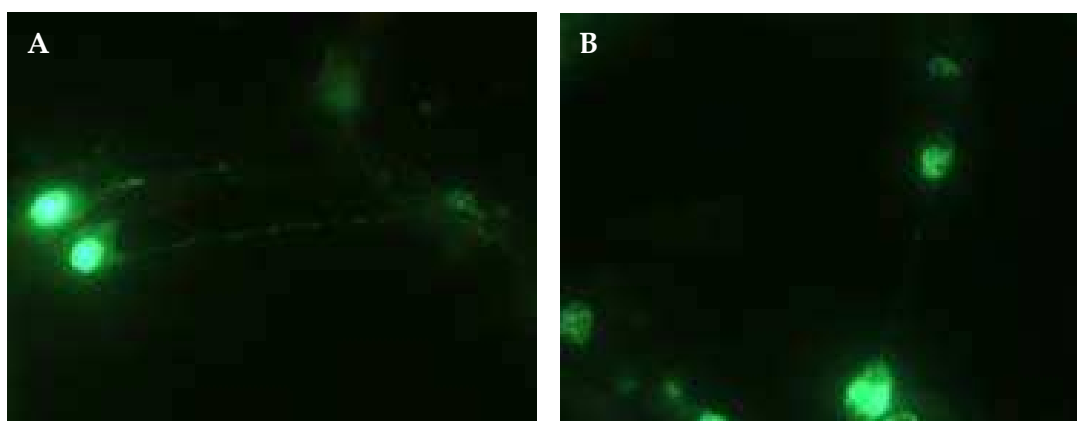
Con el fin de evaluar los efectos de la proteína mutante Us3K261D sobre la morfología celular se realizaron transfecciones transitorias con el plásmido pECFP-Us3K261D en la línea celular BHK-21 y se visualizaron las monocapas transfectadas al microscopio de fluorescencia (Figura 37).



**Figura 37:** Transfecciones transitorias en la línea celular BHK-21 con el plásmido pECFP-Us3K261D. Se muestran dos campos distintos. Aumento: 100x.

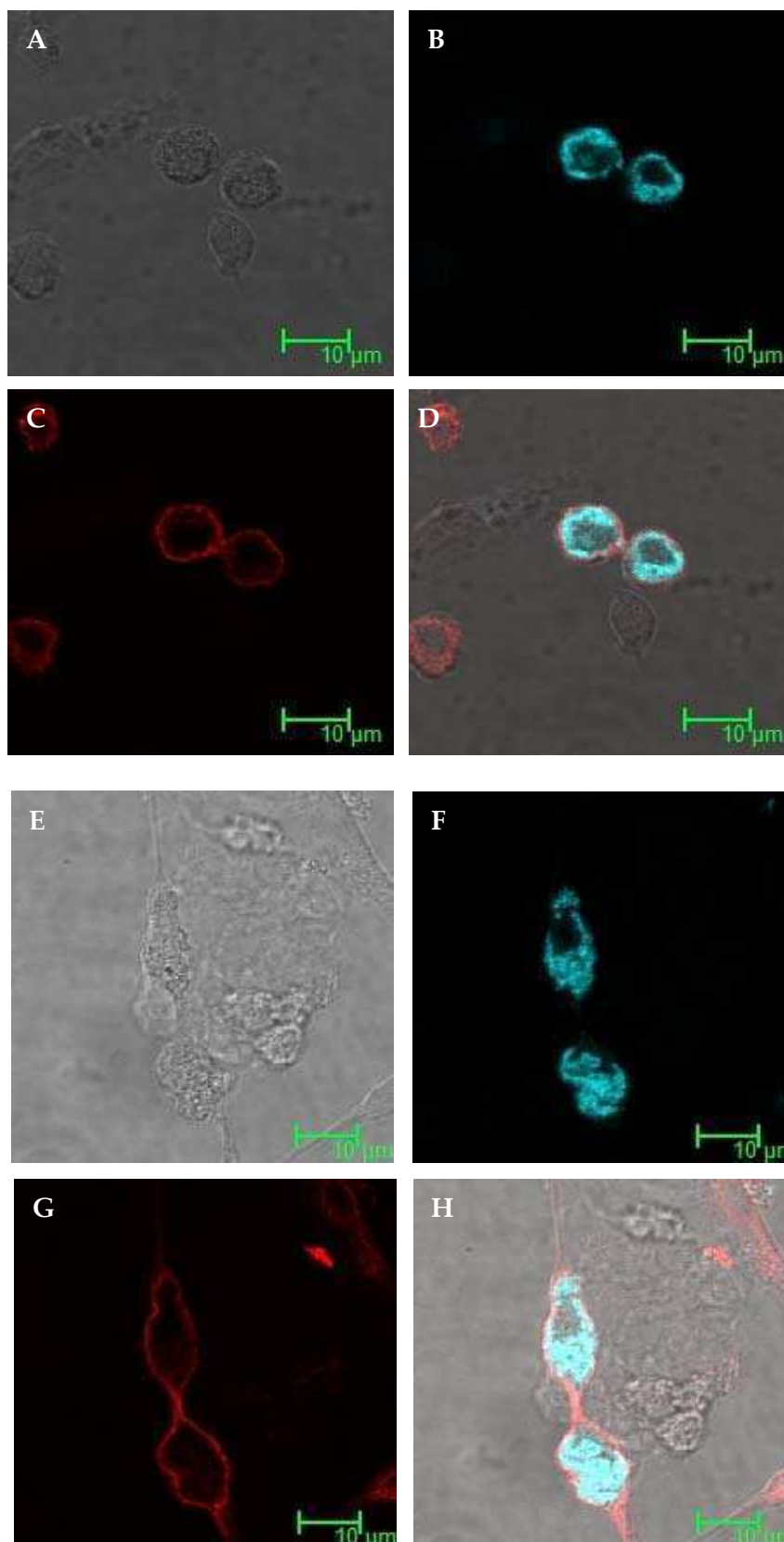
Se observó que las células transfectadas con el plásmido pECFP-Us3K261D presentaban redondeamiento celular, tal como había sido observado al transfectar con el plásmido pECFP-Us3. Sin embargo, la proteína Us3K261D presentó una localización subcelular diferente a la de la proteína Us3, encontrándose excluida del núcleo celular.

Luego se realizaron co-transfecciones transitorias en la línea celular BHK-21 con los plásmidos pECFP-Us3K261D + pTrip y a las 24 hpt las monocapas transfectadas fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Además se realizaron co-transfecciones con los plásmidos pECFP-N1 + pTrip y pECFP-Us3 + pTrip. Se observó que un menor porcentaje de células co-transfectadas con pECFP-Us3K261D + pTrip presentaban prolongaciones respecto a las células transfectadas con los plásmidos pECFP-Us3 + pTrip. Además, en caso de estar presentes, estas prolongaciones eran de menor tamaño y presentaban menos ramificaciones que las inducidas por la proteína Us3 *wt* (Fig. 38). Estos resultados indicarían que la actividad enzimática de la proteína Us3 de BoHV-5 estaría implicada en la inducción de proyecciones celulares.



**Figura 38:** Co-transfecciones transitorias en la línea celular BHK-21 con los plásmidos pECFP-Us3 + pTrip (A) y pECFP-Us3K261D + pTrip (B). Aumento: 100x.

Posteriormente, se estudió la implicancia de la actividad de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 en el desensamblado de las fibras de estrés. Para ello se realizaron transfecciones transitorias en células BHK-21 con el plásmido pECFP-Us3K261D. A las 24 hpi las células fueron fijadas y el citoesqueleto de actina fue marcado por agregado de faloidina conjugada con *Texas Red*, y se visualizó al microscopio confocal (Fig. 39).



**Figura 39:** Transfecciones transitorias con el plásmido pECFP-Us3K261D en células BHK-21. A y E: campo claro. B y F: fluorescencia correspondiente a la proteína Us3K261D-ECFP. C y G: fluorescencia correspondiente al citoesqueleto de actina. D y H: superposición de los tres campos. Aumento: 200x.

En la figura 39 se observa la localización aberrante de la proteína Us3K261D, encontrándose excluida del núcleo celular. Además, al visualizar el citoesqueleto de actina se observó la pérdida de las fibras de estrés en las células transfectadas con el plásmido pECFP-Us3K261D, tal como había sido observado al transfectar con el plásmido pECFP-Us3. Estos resultados indicarían que el desensamblado de las fibras de estrés inducido por la proteína Us3 de BoHV-5 sería independiente de su función de quinasa.



## Discusión

El herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) es un alfa herpesvirus que infecta el ganado bovino. La enfermedad causada por este agente se caracteriza por una meningoencefalitis no supurativa que puede desencadenar la muerte del animal infectado, aunque con mayor frecuencia se presentan casos de infección subclínica o signos nerviosos leves, dependiendo de factores como la cepa viral, la edad y el estado inmunológico de los animales (Barenfus *et al.*, 1963; Bartha *et al.*, 1969; Carrillo *et al.*, 1983a, b; Del Médico Zajac *et al.*, 2006; Gardiner and Nairn, 1964; Riet-Correa *et al.*, 1989).

Por razones aún no determinadas, BoHV-5 parece estar geográficamente restringido, detectándose preferentemente en el hemisferio sur (D'Arce *et al.*, 2002). Sin embargo, la distribución real y la seroprevalencia de éste agente son desconocidas debido a la falta de ensayos serológicos diferenciales entre BoHV-5 y BoHV-1 (Del Médico Zajac *et al.*, 2009a). Esto lleva a que las pérdidas económicas ocasionadas por BoHV-5 sean difíciles de estimar y probablemente sea uno de los motivos por los cuales este virus ha sido escasamente caracterizado hasta el momento (Mahoney, 2009).

La caracterización funcional de la proteína Us3 es un tema de relevancia actual en el estudio de la biología de los alfa herpesvirus (Finnen *et al.*, 2009; Labiuk *et al.*, 2009; Shumacher *et al.*, 2008; Van den Broeke *et al.*, 2009b). Esta proteína quinasa, específica de esta subfamilia de virus, se encuentra implicada en múltiples aspectos de la replicación viral, como la morfogénesis del virión, la inhibición de la apoptosis en etapas tempranas del ciclo replicativo y la inducción de modificaciones en el citoesqueleto. Investigaciones pioneras llevadas a cabo en los últimos años con la proteína Us3 de HSV y PrV pusieron de manifiesto similitudes y diferencias en la función y regulación de esta proteína en ambos virus, convirtiéndola actualmente en un blanco de estudio para distintos alfa herpesvirus.

Para contribuir al conocimiento de la biología del BoHV-5 y en particular a la caracterización de la cepa argentina A663 de BoHV-5 se plantearon en este trabajo de tesis dos abordajes diferentes que consistieron en el estudio de las propiedades replicativas *in vitro* de esta cepa y en el estudio de la función de la proteína Us3.

### Estudio de las propiedades replicativas *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5

En la temporada otoño-invierno de los años 1981/82, numerosos brotes de meningoencefalitis no supurativa fueron reportados en la región central de Argentina, entre ellos el brote A663. En todos estos brotes fue posible aislar virus a partir del cerebro de animales infectados y mediante estudios de microscopía electrónica, inmunofluorescencia y seroneutralización se diagnosticó que el agente causal era BoHV-1 (Schudel *et al.*, 1986). El virus aislado a partir de muestras correspondientes al brote A663 fue experimentalmente inoculado en bovinos y se observó que presentaba la capacidad de inducir enfermedad neurológica. Por otra parte, en 1962 se aisló en Australia un virus que presentaba estas mismas propiedades, denominado N569 (Johnston *et al.*, 1962), con lo cual dicho virus y A663 se consideraron variantes neurotrópicas de BoHV-1 (BoHV-1.3). A partir de 1992 BoHV-1.3 fue reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía Viral como un virus diferente (Roizman *et al.*, 1992) al cual se lo denominó BoHV-5.

Actualmente, la cepa A663 es considerada en el mundo una cepa de referencia de BoHV-5, sin embargo sólo ha sido caracterizada *in vitro* en base a su reactividad cruzada frente a paneles de anticuerpos monoclonales (Friedli and Metzler, 1987; Metzler *et al.*, 1986), por corrida electroforética en geles de poliacrilamida y por patrones de restricción con diversas enzimas (Brake and Studert, 1985; Engels *et al.*, 1986). Los análisis de restricción realizados sobre el genoma de las cepas A663, N569 y aislamientos brasileiros de campo de BoHV-5, permitieron su clasificación en los subtipos *b*, *a* y *no-a no-b*, respectivamente (D'Arce *et al.*, 2002; Engles *et al.*, 1986).

A diferencia de lo que ocurre con la cepa A663, la cepa australiana de referencia N569 ha sido más estudiada tanto *in vivo* como *in vitro* (Belak *et al.*, 1999; Engelhardt and Keil, 1996; Liman *et al.* 2000). Por tal motivo, los ensayos de caracterización de la replicación viral *in vitro* de la cepa A663 realizados en este trabajo de tesis, fueron también llevados a cabo con la cepa N569. La realización simultánea de los ensayos con ambas cepas facilitó el mantenimiento de las condiciones experimentales y permitió establecer comparaciones entre las mismas.

Para evaluar la producción de partículas virales, la capacidad lítica y la dispersión célula a célula de las cepas A663 y N569 de BoHV-5, se realizaron cinéticas de crecimiento viral de uno y múltiples pasos y ensayos de tamaño de placa de lisis y de infección. Se utilizó la línea celular MDBK que, a pesar de ser una línea celular transformada, mantiene características epiteliales como el alto contenido de uniones estrechas. Siendo que los alfa herpesvirus tienen tropismo por este tipo de células y las uniones estrechas son estructuras involucradas en el pasaje célula a célula, ésta línea celular es un buen modelo para el estudio de la replicación viral *in vitro* (Nakamichi *et al.*, 2002).

Las cinéticas de replicación de un único paso se realizan a alta multiplicidad de infección (MOI). Debido a que todas las células se infectan con el inóculo viral, ni la dispersión célula a célula ni la infección de células vecinas a partir de progenie viral están siendo evaluadas, sino que se evalúa la producción de partículas virales infectivas, indicada por el título viral de la fracción total (intracelular y extracelular) a un tiempo dado. Además, el momento en que se detecta virus en la fracción extracelular (medido en horas post infección, hpi) da idea del tiempo necesario para que el virus complete su ciclo de replicación y los títulos virales que se alcanzan se relacionan con la capacidad lítica del virus.

La comparación de las cinéticas de un único paso entre las cepas A663 y N569 de BoHV-5 mostró que la salida al medio extracelular es más temprana para la cepa A663, detectándose virus en la fracción extracelular 3 horas antes para esta cepa que para la cepa N569. Esto indicaría que el ciclo de replicación viral sería de menor duración para la cepa A663. Sin embargo, la capacidad lítica de la cepa A663 sería menor que la de la cepa N569, según lo indican los títulos virales alcanzados en las fracciones extracelulares. Estos títulos virales resultaron, a excepción del tiempo 6 hpi en el cual la cepa N569 no es detectable en la fracción extracelular, siempre mayores para la cepa N569 que para la cepa A663. Por otra parte, en base a los títulos virales obtenidos en las fracciones totales, la producción viral de ambas cepas resultó similar a lo largo de todo el ensayo.

Hasta el momento, escasos trabajos se han realizado con el objetivo de caracterizar *in vitro* las cepas A663 y N569. En este aspecto, Schudel *et al.* (1986) compararon las propiedades replicativas de la cepa A663 con una cepa de referencia de BoHV-1 (Jura/78) en la línea

celular MDBK. Estos autores observaron que la cepa A663 presentaba una cinética de crecimiento lenta y producía bajos títulos virales. Sin embargo, las condiciones bajo las cuales se realizó este estudio (MOI, tiempos ensayados, etc.) difieren de las utilizadas en este trabajo de tesis y no permiten establecer comparaciones directas entre los resultados obtenidos. Por otra parte, Meurens *et al.* (2004) realizaron la cinética de crecimiento de un único paso de la cepa N569 de BoHV-5 bajo condiciones similares a las utilizadas en este trabajo de tesis. Al comparar los resultados obtenidos en esta tesis con los previamente publicados se observó que el perfil de las curvas correspondientes a los títulos virales de las fracciones extracelulares obtenidas en ambos casos fue similar. Además, el período de latencia, definido como el tiempo transcurrido entre la infección de la monocapa celular y el último tiempo en el cual no se detecta virus en la fracción extracelular, fue en ambos trabajos de 6 horas.

Para estudiar fenotípicamente la capacidad lítica de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 se realizaron ensayos de tamaño de placa de lisis. La observación al microscopio de las placas de lisis generadas por ambas cepas virales sobre monocapas de células MDBK evidenció las diferencias en la capacidad lítica sugeridas por las cinéticas de un único paso. Las placas de lisis generadas por la cepa A663 resultaron más de 10 veces menores que las generadas por la cepa N569. Esta diferencia fue mucho mayor que la esperada en base a los resultados obtenidos en la cinética de un único paso y sugirió que otro aspecto, además de la capacidad lítica, se encontraba afectado en la cepa A663 respecto de la N569.

El ensayo de tamaño de placa de lisis se realiza a baja MOI y en presencia de un medio semisólido el cual dificulta el egreso y la difusión de los viriones, y en consecuencia, la adsorción de los mismos a las células vecinas no infectadas. Por lo tanto, otro mecanismo de diseminación del virus entra en juego: la dispersión célula a célula. Ésta podría estar contribuyendo a las diferencias en el tamaño de placa de lisis generadas por ambas cepas de BoHV-5. Sin embargo, diferencias tan marcadas en el tamaño de placa de lisis entre dos cepas *wild type* (*wt*) de un mismo virus no fueron observadas hasta el momento para otros alfa herpesvirus. En cambio, se han evidenciado diferencias en el tamaño de placa de lisis al comparar entre sí cepas *wt* y mutantes con deleciones en distintos genes. En este aspecto, una

cepa de BoHV-1 deletada en el gen codificante para la glicoproteína E (gE) y una cepa de PrV deletada en el gen codificante para la proteína UL51 generan placas de lisis 4 y 3 veces menores, respectivamente, que las de sus parentales *wt* (Klupp *et al.*, 2005; Rebordosa *et al.*, 1996). Reducciones en el tamaño de placa de lisis del mismo orden que las observadas entre las cepas A663 y N569 de BoHV-5 han sido recientemente publicadas (Kalthoff *et al.*, 2008). En dicho trabajo los autores reportan que una cepa mutante de BoHV-1 con deleciones en los genes codificantes para gE y UL49 genera placas de lisis 83% más pequeñas que las generadas por el virus salvaje.

Las cepas A663 y N569 de BoHV-5 no han sido ampliamente caracterizadas desde el punto de vista genómico, pudiendo existir entre ellas diferencias tan marcadas como mutaciones de genes no esenciales para su replicación que explicarían los fenotipos en el tamaño de placa de lisis observados. En este sentido, recombinaciones espontáneas en la región US de varios alfa herpesvirus, y la consecuente delección de genes, han sido reportadas previamente y probablemente contribuyan a las diferencias genómicas observadas entre estos virus (Davison and McGeoch, 1986). En este aspecto, Rijsewijk *et al.* (1999) reportaron el aislamiento de mutantes espontáneos de BoHV-1 (Za y Rof3) que presentaban una duplicación e inversión de la región US1.5/US2 y la delección simultánea de parte de la región US7 (gI)/US8 (gE)/US9. Estos mutantes presentaron un fenotipo de tamaño de placa menor que el del virus BoHV-1 *wt*. Además, la cinética de un único paso mostró diferencias en la producción de partículas virales y en la liberación de virus al medio extracelular entre la cepa mutante Za y la cepa *wt* de BoHV-1. Sin embargo, hasta que no se lleven a cabo ensayos más exhaustivos con las cepas A663 y N569 de BoHV-5 que permitan abordar este aspecto, las mutaciones génicas y su contribución a las diferencias fenotípicas observadas *in vitro* son simplemente una especulación.

Por otro lado, la atenuación del fenotipo *in vivo* del agente infeccioso causada por pasajes previos por células ha sido demostrada para otros alfa herpesvirus (Dudnikova *et al.*, 2009). Cuanto mayor sea el número de pasajes, mejor adaptado estará un virus a la línea celular en la que se realiza el pasaje. Esta adaptación podría manifestarse, por ejemplo, en el tamaño de placa de lisis, por ser éste un parámetro relacionado con la replicación viral. Si

bien en este trabajo las cepas A663 y N569 utilizadas presentaron inicialmente distinto número de pasajes, la repetición de los resultados al utilizar cepas de igual número de pasajes descartaría la posibilidad de que las diferencias observadas en el tamaño de placa de lisis correspondan a diferencias en el número de pasajes por líneas celulares. Sin embargo, los *stocks* virales de número de pasaje conocido de las cepas N569 y A663 de BoHV-5 se obtuvieron a partir de virus excretado por bovinos experimentalmente infectados con virus N569 y A663 que ya presentaban cierto grado de adaptación al crecimiento en cultivos celulares. Si bien estos virus replicaron en el hospedador natural y se excretaron, esto no significa necesariamente que hayan perdido su adaptación al crecimiento *in vitro*. Por lo tanto, a pesar de haber utilizado *stocks* virales de las cepas A663 y N569 de igual número de pasajes, no podemos descartar que estos virus presenten diferentes grados de adaptación al crecimiento en cultivos celulares.

Para estudiar con mayor detalle las diferencias en el pasaje célula a célula sugeridas por la cinética de un único paso y por el ensayo de tamaño de placa de lisis, se realizaron cinéticas de múltiples pasos y un ensayo de tamaño de placa de infección viral.

Las cinéticas de replicación de múltiples pasos se realizan a baja MOI, lo cual permite evaluar la dispersión del virus desde las células infectadas hacia las células vecinas, ya sea por la salida de la progenie viral al medio extracelular e infección de células adyacentes, o por el mecanismo de dispersión célula a célula. Las diferencias observadas en los títulos virales de las fracciones extracelulares de las cepas A663 y N569 en la cinética de múltiples pasos fueron mayores que los observados en la cinética de un único paso. Esto podría deberse a la contribución del fenómeno de dispersión célula a célula, ausente en la cinética de un único paso, tal como lo sugirió el ensayo de tamaño de placa de lisis.

Para eliminar el componente poblacional característico de la cinética de múltiples pasos y realizar una observación directa del fenómeno de dispersión célula a célula se determinó el tamaño de las placas de infección generadas por las cepas A663 y N569 luego de la infección de monocapas de células MDBK. Se observó que el tamaño promedio de los focos de infección generados por la cepa A663 era 80% más pequeño que el generado por la cepa

N569, indicando que la dispersión célula a célula se encuentra disminuida en la cepa A663 respecto de la cepa N569.

La utilización de la técnica de inmunofluorescencia resulta adecuada para el estudio de la dispersión célula a célula. Varios autores abordan el estudio de este mecanismo de diseminación mediante el análisis de las placas de lisis, sin embargo, de ésta manera sólo se consideran las células que han sido infectadas y removidas de la monocapa celular, mientras que el estudio de las placas de infección por inmunofluorescencia permite además detectar las células que han sido infectadas y que aún permanecen adheridas a la placa. En casos en los cuales la capacidad lítica de las cepas estudiadas es baja o se encuentra disminuida, como ocurre con la cepa A663 respecto de la N569, analizar la dispersión célula a célula mediante el ensayo de placa de lisis sobreestima las diferencias en comparación con la medición del tamaño de placa de infección (nótese que las placas de lisis de A663 fueron 10 veces menores que las de N569 mientras que las de infección resultaron 5 veces menores.).

En conjunto, el análisis de los datos de replicación viral *in vitro* indica que tanto la capacidad lítica como la dispersión célula a célula son menores en la cepa A663 que en la cepa N569. La liberación de partículas virales infectivas al medio extracelular sería menor para la cepa A663 mientras que la producción total de partículas virales infectivas sería similar. Estas diferencias observadas *in vitro* podrían tener implicancias *in vivo* y su estudio permitiría conocer nuevos aspectos de la replicación de BoHV-5 y en particular de virus pertenecientes a distintos subtipos de BoHV-5.

En este sentido, la producción total *in vitro* de partículas virales infectivas podría relacionarse con los niveles de excreción viral, tanto en la infección primaria como luego de la reactivación. Por otro lado, la disminución en la dispersión célula a célula observada *in vitro* podría tener implicancias en la diseminación del virus y su llegada a los distintos tejidos del animal durante la infección. De esta manera, la posibilidad de acceder a las terminaciones nerviosas de las neuronas sensitivas en la puerta de entrada, y por lo tanto a los sitios de latencia, podría ser mayor para virus que presenten una mayor dispersión célula a célula. En este sentido, han sido reportados sitios adicionales de latencia en animales latentemente infectados con BoHV-5 que fueron reactivados (Vogel *et al.*, 2003). Estos autores especulan que



la distribución del ADN latente en áreas profundas del cerebro facilitaría la dispersión viral y neuroinvasión que se observa durante la reactivación. Por lo tanto, la capacidad de diseminación de BoHV-5 estaría asociada al desarrollo de enfermedad neurológica.

Por otro lado, la disminución en la capacidad lítica podría reflejarse en el nivel de daño de los tejidos y por lo tanto en la signología clínica de los animales luego de la infección. Asimismo, Pérez *et al.* (2002) infectaron bovinos experimentalmente con una cepa argentina de BoHV-5 (97/163) y detectaron necrosis de tejido nervioso, consecuencia del daño citopático que produce la replicación viral, sólo en los animales que presentaron síntomas neurológicos. Por otra parte, Meyer *et al.* (2001) analizaron la presencia de antígenos virales en muestras de cerebro de animales infectados con la cepa N569 de BoHV-5 que desarrollaron enfermedad neurológica. Estos autores detectaron antígenos virales casi exclusivamente en las regiones del CNS que presentaban lesiones inflamatorias (Meyer *et al.*, 2001).

Si bien no fue el objetivo de este trabajo, es importante destacar que debido a que no siempre se encuentra una correlación entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de un virus, sería interesante evaluar a las cepas A663 y N569 en infecciones en el hospedador natural para determinar las posibles implicancias de las diferencias replicativas observadas *in vitro*.

### **Caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5**

Como se mencionó previamente, la proteína Us3 es una proteína quinasa (Frame *et al.*, 1987; Purves *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1990). Los herpesvirus codifican en sus genomas otras dos proteínas quinasas, codificadas por los genes *UL13* y *UL39*, las cuales se encuentran presentes en las subfamilias *alfa*, *beta* y *gammaherpesvirinae*. A diferencia de lo que ocurre con *UL13* y *UL39*, la proteína Us3 se encuentra presente únicamente en la familia *alfaherpesvirinae*.

Numerosos estudios están siendo llevados a cabo con las proteínas Us3 de PrV y HSV con el fin de caracterizarla y comprender mejor el rol que esta proteína cumple en el ciclo de

replicación viral (Sagou *et al.*, 2009; Van den Broeke *et al.*, 2009 a y b; Wisner *et al.*, 2009). A diferencia de esto, la proteína Us3 de BoHV-5 no ha sido estudiada hasta el momento.

La secuenciación completa del genoma de la cepa SV507/99 de BoHV-5 (Delhon *et al.*, 2003, GenBank AY261359) facilitó la amplificación y secuenciación de los genes codificantes para las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569, que constituyeron los primeros datos genómicos de acceso libre de estas cepas (GenBank GQ386987 y GQ415411 para las secuencias codificantes para Us3 de las cepas A663 y N569, respectivamente). El porcentaje de homología entre las proteínas Us3 de las cepas SV507/99, A663 y N569 resultó ser mayor al 90% y cercano al 45% cuando se las comparó con las proteínas Us3 de PrV y HSV.

La identificación *in silico* de un dominio de proteína quinasa y un putativo sitio activo de serina/treonina quinasa en las secuencias aminoacídicas de las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569 resultó relevante, ya que sugiere que esta función se encontraría conservada entre proteínas Us3 de distintos alfa herpesvirus.

Al comparar las secuencias aminoacídicas de las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569 se observaron pocos cambios puntuales. Sin embargo, se identificó una inserción de 14 aminoácidos en la secuencia correspondiente a la proteína Us3 de la cepa N569 respecto de la cepa A663. Esta inserción se encuentra por fuera del dominio de proteína quinasa y por lo tanto no altera el sitio activo de la proteína Us3. En base a esto, se asumió que no habría grandes diferencias en la función catalítica de las proteínas Us3 de las cepas A663 y N569, aunque sí podría haber alguna diferencia en la regulación o eficiencia con la que estas proteínas llevan a cabo su función.

En base a estudios realizados principalmente con la proteína Us3 de PrV, se conoce que ésta contribuye a la dispersión célula a célula a través de la inducción de proyecciones que comunican células distantes entre sí y permiten la diseminación viral (Favoreel *et al.*, 2005). Este tipo de diseminación célula a célula difiere del estudiado en esta tesis en los ensayos de tamaño de placa de lisis y foco de infección realizados con las cepas A663 y N569, en los cuales se evalúa la dispersión entre células adyacentes. Debido a esto y a la naturaleza multifuncional del mecanismo de dispersión célula a célula de los herpesvirus, no

establecimos ninguna relación directa entre las diferencias replicativas observadas *in vitro* entre ambas cepas de BoHV-5 y en las encontradas en las secuencias codificantes para la proteína Us3.

Por tratarse de una cepa aislada en nuestro país y sobre la cual poseemos mayor trazabilidad y conocimiento, se decidió llevar a cabo los estudios de caracterización de la expresión y funcionalidad de la proteína Us3 de BoHV-5 con la cepa A663.

El estudio de la expresión del gen *us3* durante la replicación *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5 realizado en este trabajo de tesis, evidenció que éste se expresa temprana y prolongadamente a nivel transcripcional y proteico. Según lo reportado para HSV y PrV, la proteína Us3 está involucrada en múltiples funciones que se desarrollan durante todo el ciclo de replicación del virus y que requieren, por lo tanto, la expresión temprana y prolongada en el tiempo de dicha proteína. Los resultados obtenidos al estudiar la expresión del gen *us3* de BoHV-5 están en concordancia con esta observación. Durante las primeras horas luego de la infección, la proteína Us3 ejerce un rol antiapoptótico (Asano *et al.*, 2000). Siendo que los virus son parásitos obligados, codificar en su genoma proteínas que permitan contrarrestar la apoptosis celular inducida por virus permite que éstos puedan utilizar la maquinaria celular para su propia replicación. Por otra parte, estudios realizados con la proteína Us3 de HSV y PrV demostraron que ésta cumple un rol en la morfogénesis de la partícula viral, permitiendo que los viriones primarios egresen del núcleo celular (Klupp *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002). Este rol de la proteína Us3 es posterior a la expresión de los genes virales tardíos (proteínas estructurales). Asimismo, las alteraciones en el citoesqueleto inducidas por Us3, como el desensamblado del mismo y la formación de proyecciones que comunican células entre sí, favorecen la dispersión de las partículas virales ya formadas, fenómeno que ocurre tardíamente en el ciclo de replicación viral (Favoreel *et al.*, 2005).

Los genes *us3* y *gG* (*us4*) de los alfa herpesvirus PrV, HSV y BoHV-1 se transcriben como una única unidad transcripcional, encontrándose la señal de poliadenilación río abajo del gen *gG* (Leung-Tack *et al.*, 1994, Rea *et al.*, 1985; Rixon *et al.*, 1985). Debido a esto, en ensayos de *Northern blot* se observa que el ARN mensajero específico para Us3 presenta un mayor tamaño que el esperado y es reconocido, además, por una sonda específica para el gen

gG (Zangh *et al.*, 1990). Los ensayos de *Northern blot* llevados a cabo en este trabajo de tesis permitieron determinar la expresión bicistrónica de los genes *us3* y *gG* en la cepa A663 de BoHV-5, en concordancia con lo reportado para otros alfa herpesvirus. Además, el análisis transcripcional del gen *us3* durante la infección con BoHV-5 evidenció la presencia de un único ARN mensajero. A diferencia de lo reportado para PrV (Van Minnebruggen *et al.*, 2003), este resultado indicaría que en BoHV-5 no habría más de un transcripto codificante para Us3. También se observó que el ARN mensajero único codificante para Us3 se expresa en forma más abundante durante las primeras horas del ciclo de replicación de BoHV-5 y su expresión disminuye hacia el final del mismo.

Para realizar los estudios de caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5 que se discuten a continuación resultó indispensable obtener un suero específico contra esta proteína. Debido a que se presentaron dificultades en la expresión de la proteína Us3 completa en el sistema procariota, se optó por la expresión de fragmentos de la misma. Para la elección de los fragmentos se realizó un análisis con herramientas bioinformáticas que permitió identificar regiones en la proteína Us3 que tuvieran alta hidrofiliidad y contuvieran epitopes B. Las regiones hidrofílicas tienden a estar expuestas en la proteína, aumentando así la posibilidad de generar anticuerpos que reconozcan luego a la proteína nativa. Mediante esta estrategia, se logró la expresión del fragmento Us3F2, el cual fue purificado e inoculado en ratones, obteniéndose de esta manera un suero policlonal específico contra la proteína Us3 de BoHV-5.

El análisis de la expresión de la proteína Us3 en células infectadas con BoHV-5 se realizó por *Western blot* y evidenció la presencia de varias bandas reactivas. Este bandeo múltiple ha sido también observado por otros investigadores para la proteína Us3 de HSV, quienes lo atribuyen principalmente a diferentes estados de fosforilación de esta proteína (Poon *and* Roizman, 2005). La regulación de Us3 por fosforilación ha sido estudiada en HSV, observándose que Us3 es capaz de autofosforilarse (Kato *et al.*, 2008) y que es también fosforilada por otras quinasas virales (UL13) y posiblemente celulares (Poon *and* Roizman, 2005).

Sin embargo, difícilmente los distintos estados de fosforilación de la proteína Us3 sean responsables de todo el bandeo observado en los ensayos de *Western blot* mencionados

anteriormente, pudiendo estar contribuyendo al mismo la formación de homo y/o heterodímeros de la proteína Us3. Aunque ha sido reportado que la proteína Us3 es activa en su forma monomérica (Daikoku *et al.*, 1993), esto no excluye la posibilidad de que Us3 forme estructuras multiméricas. En este aspecto, Kato *et al.* (2005) demostraron que la proteína Us3 de HSV puede formar una proteína quinasa multimérica, despertando interrogantes sobre las condiciones que determinarían la formación de estas estructuras y sobre la similitud funcional de la quinasa multimérica y la monomérica. Por otra parte, la mayoría de las proteínas quinasas que han sido cristalizadas hasta el momento se presentan formando homodímeros o heterodímeros. Como primera aproximación a este estudio, se realizaron análisis *in silico* con la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 que efectivamente predijeron la formación de homodímeros.

En células infectadas con PrV, como resultado de *splicing* alternativo y de la presencia de codones alternativos de iniciación de la traducción, el marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) Us3 se transcribe y traduce en una isoforma larga de 53 KDa (que representa menos del 5% de la proteína Us3) y una isoforma corta de 41 KDa (que representa el 95% de la proteína Us3). Ambas isoformas de la proteína Us3 comparten el dominio de proteína quinasa pero presentan un extremo N-terminal divergente, en el cual la isoforma larga presenta una secuencia de localización mitocondrial de 51 aminoácidos que no se encuentra en la isoforma corta (Van Minnebruggen *et al.*, 2003). En cuanto a HSV, también han sido detectadas dos isoformas de la proteína Us3 denominadas Us3 (de 481 aminoácidos) y Us3.5 (de 405 aminoácidos). En este caso, se ha sugerido que estas isoformas se traducirían a partir de ARN mensajeros independientes, y, al igual que para PrV, las diferencias se encuentran en el extremo N-terminal, comenzando la isoforma corta en la metionina 77 correspondiente a la isoforma larga.

Las isoformas de Us3 conservan algunas funciones pero difieren en otras. Las isoformas Us3 y Us3.5 de HSV-1 fosforilan deacetilasas de histonas (HDAC) (Poon *et al.*, 2003; Poon y Roizman, 2005), pero a diferencia de Us3, Us3.5 no es capaz de prevenir la apoptosis inducida por virus mutantes o por la activación de proteínas celulares pro apoptóticas (Benetti *et al.*, 2003; Munger *et al.*, 2001; Poon and Roizman, 2005). Por su parte,

las células transfectadas con la isoforma corta de Us3 de PrV presentaron una menor protección frente a la apoptosis inducida por virus mutantes o por inductores exógenos, como la estaurosporina, en comparación con las células transfectadas con la isoforma larga de Us3 de PrV (Geenen *et al.*, 2005).

El análisis del bandeo específico de la proteína Us3 observado por *Western blot* a partir de extractos proteicos provenientes de células infectadas con BoHV-5, mostró, además de las múltiples bandas discutidas anteriormente, dos bandas de menor tamaño (aproximadamente 34 KDa), detectables a partir de las 8 hpi. En la posición 186 de la secuencia lineal de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 se encuentra una segunda metionina que, en caso de ser un codón alternativo de iniciación de la traducción, codificaría para una proteína de aproximadamente 30 kDa, en concordancia con lo observado en este trabajo de tesis. Sin embargo, la metionina 186 se encuentra dentro del dominio de proteína quinasa (comprendido entre el aminoácido 144 y 449 de la proteína Us3 de BoHV-5), a diferencia de lo que ocurre en HSV y PrV, y podría ocurrir que esta función se vea afectada en caso que existiera esta isoforma de menor tamaño de la proteína Us3 de BoHV-5. Por lo tanto, resta dilucidar si las bandas de 34 KDa observadas en este trabajo en los ensayos de *Western blot* corresponden a isoformas de la proteína Us3 y en caso afirmativo, si conservan su función de proteína quinasa.

Para estudiar el rol de ciertas proteínas virales, tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden desarrollarse virus recombinantes con deleciones en los genes que codifican para las mismas. Durante el desarrollo de esta tesis, y con el fin de abordar la caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5, se trabajó en la obtención del virus recombinante BoHV-5 $\Delta$ Us3 (resultados no mostrados).

El gran tamaño del genoma de los herpesvirus descarta la manipulación directa del ADN. Por ello, los virus recombinantes se obtienen por recombinación homóloga entre el genoma viral y un vector de transferencia (VT) que porta un *cassette* para la expresión de un gen marcador flanqueado por regiones genómicas que serán el blanco de inserción.

En nuestro caso, se obtuvo el vector de transferencia VT-Us3GUS, en el cual el *cassette* para la expresión del gen marcador *uid A* codificante para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) se

encuentra flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen codificante para la proteína Us3. Este vector fue caracterizado genética y funcionalmente *in vitro* mediante digestiones con enzimas de restricción, secuenciación y ensayos de actividad de la enzima GUS (Ladelfa *et al.*, 2006).

Para la obtención del virus recombinante BoHV-5ΔUs3 por recombinación homóloga, se co-transfectaron células susceptibles a BoHV-5 con el ADN viral y el VT-Us3GUS. Si bien se observó la presencia de focos de infección viral conformados por células teñidas de color celeste (GUS positivas), esta condición no se mantuvo durante la amplificación de estos focos virales, con lo cual no fue posible la obtención del virus recombinante BoHV-5ΔUs3.

Consideramos que los resultados obtenidos podrían deberse a la formación de virus recombinantes inestables, originados por recombinación en un único sitio del genoma viral con el VT-Us3GUS. Esta recombinación simple lleva a la incorporación del VT completo en el genoma viral y no al reemplazo alélico del gen *us3* por el *cassette* marcador. En posteriores eventos de replicación del genoma viral estos recombinantes inestables se resolverán, pudiendo originar virus *wt* o virus recombinante, deletado en el gen *us3*. El virus *wt* presenta mayor *fitness* que el virus recombinante y, frente a nuestros resultados, parecería que el equilibrio se desplaza fuertemente hacia la formación de virus *wt*.

Al no haberse obtenido el virus recombinante BoHV-5ΔUs3, se decidió continuar la caracterización de la proteína Us3 de BoHV-5 mediante ensayos de transfección de cultivos celulares con un plásmido codificante para la proteína Us3. Para ello se realizó una construcción genética donde la región codificante para la proteína Us3 se clonó en marco de lectura continuo con la secuencia codificante para la proteína fluorescente ECFP (pECFP-US3). Esta construcción se utilizó en experimentos de transfección transitoria en las líneas celulares BHK-21 y VERO, mediante los cuales se abordaron aspectos relacionados con la interacción entre la proteína Us3 de BoHV-5 y el citoesqueleto de actina.

Los virus invaden las células eucariotas y completan su ciclo de replicación utilizando la maquinaria celular de sus hospedadores. Se ha sugerido que el desensamblado de componentes específicos del citoesqueleto es relevante para la replicación y dispersión eficiente de los virus (Joachims *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2002; Wallin, *et al.*, 1990).

En este aspecto, los estudios realizados en este trabajo de tesis para conocer las funciones de la proteína Us3 de BoHV-5 demostraron que esta proteína induce el redondeamiento celular, la formación de proyecciones de actina y provoca el desensamblado de las fibras de estrés. Debido a que estos estudios se realizaron mediante experimentos de transfección, se deduce que la proteína Us3, en ausencia de otras proteínas virales, es responsable de alterar el citoesqueleto. Además, se observó que la proteína Us3 no se distribuye uniformemente en la célula, sino que se localiza en acúmulos discretos.

En los experimentos de co-transfección realizados con los plásmidos pECFP-Us3 y pTrip (codificante para la proteína GFP, la cual se localiza uniformemente en las células) se observaron proyecciones que comunicaban células entre sí. Estas proyecciones se visualizaron de color verde con el microscopio de fluorescencia, indicando que la proteína GFP se localizaba en ellas y sugiriendo que estas proyecciones permitirían el transporte de moléculas entre las células conectadas e incluso el transporte de partículas virales, facilitando de este modo la dispersión célula a célula. Cuando se transfectó únicamente el plásmido pECFP-Us3, estas proyecciones fueron más difíciles de visualizar, sugiriendo que la proteína Us3 induce las proyecciones de actina pero no se localiza necesariamente en ellas.

Modificaciones del citoesqueleto similares a las observadas con la proteína Us3 de BoHV-5 se han reportado con la proteína Us3 de otros alfa herpesvirus (Brzozwska *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2000; Van Minnerbruggen *et al.*, 2003).

La proteína Us3 de PrV se encuentra involucrada en el desensamblado de los filamentos de actina (Van Minnerbruggen *et al.*, 2003) y en la formación de largas proyecciones celulares de actina y tubulina a través de las cuales las partículas virales se diseminan hacia otras células (Calton *et al.*, 2004; Favoreel *et al.*, 2005). El mecanismo de dispersión célula a célula es una de las estrategias desarrolladas por los herpesvirus durante su evolución y presenta un alto valor adaptativo, ya que permite disminuir y retrasar el reconocimiento y la eliminación de las partículas virales por distintos componentes del sistema inmune del hospedador (revisado en Favoreel *et al.*, 2006). En este sentido, el movimiento de PrV dentro de las proyecciones inducidas por la proteína Us3 se encuentra



asociado con un incremento en la dispersión viral en presencia de anticuerpos neutralizantes (Favoreel, *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Avitabile *et al.* (1995) demostraron que la proteína Us3 de HSV-1 también interactúa con el citoesqueleto, sin embargo, lo hace principalmente a través del desensamblado de los microtúbulos y no de los filamentos de actina. Además, la inducción de proyecciones al infectar cultivos celulares con HSV-1 ha sido observada y se cree que podría tener implicancias en la dispersión viral (La Boissiere *et al.*, 2004). Por otra parte, el desarrollo de una línea celular que expresa la proteína Us3 de HSV-2 de manera inducible, evidenció cambios en la morfología celular y en el citoesqueleto como consecuencia de la expresión de dicho gen (Murata *et al.*, 2000). Estos cambios consistieron en el redondeamiento celular, la disrupción de los filamentos de actina y la acumulación de células binucleadas.

El desensamblado de las fibras de estrés de actina ha sido observado en células infectadas con el virus de la enfermedad de Marek (MDV), mientras que células infectadas con un virus MDV recombinante que no expresa la proteína Us3, no presentan alteraciones del citoesqueleto (Schumacher *et al.*, 2005). Además, estos mismos autores observaron el desensamblado de las fibras de estrés mediante ensayos de transfección transitoria realizados con un plásmido codificante para la proteína Us3 de MDV, evidenciando el rol de esta proteína en este fenómeno. Sin embargo, y a diferencia de lo reportado para la proteína Us3 de PrV, este efecto es transitorio y las células presentan el citoesqueleto de actina intacto a tiempos tardíos post transfección. Como posibles explicaciones a estos resultados, Schumacher *et al.* (2005) mencionan que i) la proteína Us3 no sería absolutamente necesaria para el desensamblado de las fibras de estrés en células infectadas con MDV, especialmente a tiempos de infección tardíos, ii) la acción de la proteína Us3 de MDV sería transitoria y iii) la despolimerización requeriría de otras proteínas virales. Por otra parte, la inducción de proyecciones celulares de actina no ha sido reportada para la proteína Us3 de MDV (Van den Broeke *et al.*, 2009a).

Finalmente, estudios de transfección transitoria realizados recientemente con plásmidos codificantes para la proteína Us3 de BoHV-1 demostraron que su expresión produce cambios en la morfología celular e induce la formación de proyecciones celulares de actina y tubulina (Brzozwska *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento si esta proteína provoca el desensamblado de las fibras de estrés de actina.

Según lo expuesto en los párrafos anteriores, la proteína Us3 de los alfa herpesvirus PrV, HSV-1, HSV-2, BoHV-1 y BoHV-5 induce la formación de proyecciones de actina. Aunque hasta el momento sólo ha sido comprobada la dispersión viral de PrV mediante estas proyecciones, este fenómeno podría representar un aspecto novedoso en la dispersión viral de diversos alfa herpesvirus en presencia de anticuerpos neutralizantes (Favoreel, 2006).

Luego de haber observado que la proteína Us3 de BoHV-5 inducía el desensamblado del citoesqueleto de actina y la formación de proyecciones celulares, se estudió si su actividad de proteína quinasa era requerida para estos efectos.

En base al alineamiento múltiple de secuencias primarias de proteínas quinasas eucariotas, las serina-treonina quinasas, incluyendo la proteína Us3 de los alfa herpesvirus, han sido subdivididas en doce subdominios (Hanks *et al.*, 1995). Estos subdominios se definen como regiones con patrones característicos de aminoácidos conservados implicados en la actividad enzimática, que se encuentran ininterrumpidas por grandes inserciones aminoacídicas. El subdominio II contiene una lisina (K) conservada implicada en la unión y orientación del ATP; su presencia es requerida para la actividad catalítica de las proteínas quinasas. El subdominio VI contiene un ácido aspártico (D) conservado, involucrado en la fosfotransferencia y también requerido para una óptima actividad enzimática. El subdominio VIb incluye el sitio activo de las proteínas quinasas y contiene una lisina implicada en la fosfotransferencia (Hanks *et al.*, 1995). Este subdominio se encuentra altamente conservado entre las proteínas Us3 de distintos alfa herpesvirus (Schumacher *et al.*, 2008).

Para estudiar la implicancia de la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 en las modificaciones inducidas sobre el citoesqueleto de actina, se eligió expresar y estudiar la proteína mutante Us3K261D de BoHV-5, que carece de actividad de quinasa. La secuencia nucleotídica codificante para esta proteína presenta una mutación en el codón codificante para la lisina correspondiente a la posición 261 de la proteína Us3 de BoHV-5. Esta mutación provoca la sustitución de lisina por ácido aspártico en el sitio activo de la proteína Us3 de BoHV-5. Ha sido reportado que la sustitución de la lisina conservada presente en el sitio activo de la proteína Us3 de BoHV-1 lleva a la pérdida de su función catalítica (Labiuk *et al.*, 2009). Al igual que para la expresión de la proteína Us3 *wt* de BoHV-5, se realizó una construcción genética donde la región codificante para la proteína Us3K261D se clonó en marco de lectura continuo con la secuencia codificante para la proteína fluorescente ECFP (pECFP-US3K261D).

En los experimentos de transfección transitoria realizados con el plásmido codificante para la proteína Us3K261D de BoHV-5, se observó que ésta presenta una localización subcelular diferente a la de la proteína Us3 *wt*, observándose la exclusión del núcleo celular (en aproximadamente el 60% de las células transfectadas). Además, se observó que la proteína Us3K261D induce la formación de proyecciones celulares en menor medida que la proteína Us3 *wt* y sería capaz de inducir el desensamblado de las fibras de estrés.

El requerimiento de la actividad de quinasa de la proteína Us3 en la inducción de cambios en el citoesqueleto de actina ha sido estudiado para diversos alfa herpesvirus.

En la proteína Us3 de PrV, la lisina correspondiente a la posición aminoacídica 136 se encuentra en el putativo dominio de unión a ATP y es esencial para la actividad enzimática de esta proteína, ya que se observó que la proteína mutante Us3K136Q de PrV no presenta actividad de quinasa (Deruelle *et al.*, 2007). Por otra parte, el ácido aspártico correspondiente a la posición aminoacídica 223 de la proteína Us3 de PrV es también un aminoácido conservado en las serina-treonina quinasas (Hanks *and* Hunter, 1995). Este aminoácido se encuentra involucrado en la fosfotransferencia y la sustitución del mismo lleva a la pérdida de la actividad de quinasa (Van den Broeke *et al.*, 2009a).

Ensayos de transfección transitoria llevados a cabo con los plásmidos codificantes para las proteínas mutantes Us3K136G y Us3D223A de PrV evidenciaron que la actividad de quinasa de la proteína Us3 de PrV es esencial para inducir las modificaciones del citoesqueleto de actina (Van den Broeke *et al.*, 2009a). Al transfectar células con los plásmidos codificantes para estas proteínas mutantes no se observa la formación de proyecciones celulares ni el desensamblado de las fibras de estrés (Van den Broeke *et al.*, 2009a). Asimismo, estos resultados fueron observados en experimentos de infección realizados con virus PrV recombinantes que no expresan la proteína Us3 (PrV-Us3*null*) o expresan una proteína Us3 mutante que carece de actividad de quinasa (PrV-Us3D223A) (Van den Broeke *et al.*, 2009a). En este aspecto, si bien la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 estaría implicada en la formación de las proyecciones de actina, nuestros resultados sugieren que esta función enzimática no sería requerida para el desensamblado de las fibras de estrés, en contraposición a lo reportado para PrV.

Por otra parte, si bien los alfa herpesvirus codifican en sus genomas para otras dos proteínas quinasas, ha sido reportado para PrV que esas quinasas no son capaces de producir el desensamblado del citoesqueleto de actina (Van Minnebruggen *et al.*, 2003), poniendo de manifiesto la relevancia de la proteína Us3 en la inducción de modificaciones del citoesqueleto de actina.

El requerimiento de la actividad de quinasa de la proteína Us3 de HSV-2 para la inducción de alteraciones morfológicas también ha sido demostrado mediante la expresión de proteínas mutantes. Para ello, Murata *et al.*, (2000) construyeron plásmidos codificantes para proteínas mutantes de Us3 que presentaban delecciones de los subdominios catalíticos I + II y VI + VII. Al transfectar células COS-1 con estos plásmidos, estos autores no observaron redondeamiento celular (Murata *et al.*, 2000). Más recientemente, Finnen *et al.* (2009) estudiaron el requerimiento de la actividad de quinasa de la proteína Us3 de HSV-2 a través de mutantes de Us3 con interrupciones más precisas de dicha actividad. Al igual que en los experimentos de Murata *et al.*, las proteínas Us3K220M y Us3D305A no indujeron el redondeamiento celular en células VERO. Además, se observó que estas proteínas mutantes

inducían proyecciones celulares más cortas y menos ramificadas que las inducidas por la proteína Us3 *wt* de HSV-2 (Finnen *et al.*, 2009).

La pérdida de la actividad enzimática por sustitución de la lisina presente en el sitio activo de la proteína Us3 de BoHV-1 (K282) ha sido recientemente reportada (Labiuk *et al.*, 2009b). En base a estudios realizados con las proteínas mutantes Us3K282M, Us3K282A y Us3K282E de BoHV-1, éstos autores determinaron que, aunque no sería la principal responsable, la proteína Us3 cumple un rol en la fosforilación de la proteína VP22, componente mayoritario de la cápside de los herpesvirus (Labiuk *et al.*, 2009b). Sin embargo, los efectos sobre el citoesqueleto de actina de estas proteínas mutantes de BoHV-1 no han sido estudiados hasta el momento.

Por otra parte, Brzozwska *et al.* construyeron y estudiaron la proteína mutante Us3L265P de BoHV-1, que no presenta actividad de quinasa. En ensayos de transfección transitoria observaron que esta proteína no produce alteraciones en el citoesqueleto y es incapaz de inducir la formación de proyecciones celulares conteniendo actina y microtúbulos, evidenciando el requerimiento de la actividad enzimática de la proteína Us3 de BoHV-1 para inducir cambios en el citoesqueleto (Brzozwska *et al.*, 2009).

A diferencia de lo reportado para las proteínas Us3 de PrV, HSV-2 y BoHV-1, y en concordancia con lo observado en esta tesis para la proteína Us3 de BoHV-5, la función de quinasa de la proteína Us3 de MDV no es necesaria para inducir la reorganización del citoesqueleto de actina. Ensayos de transfección con plásmidos codificantes para las proteínas Us3 de MDV *wt* y mutada en su sitio activo de quinasa resultan en el desensamblado de las fibras de estrés de actina (Schumacher *et al.*, 2008). Sin embargo, como se mencionó previamente, este efecto es temporal y las fibras de estrés se reorganizan entre las 24 y 48 horas post transfección (Schumacher *et al.*, 2005; 2008). Esto, sumado a que la proteína Us3 de MDV no induce proyecciones celulares de actina, podría sugerir que la actividad no catalítica de la proteína Us3 de MDV sería menos robusta que la actividad catalítica de la proteína Us3 de los demás alfa herpesvirus estudiados (Van den Broeke *et al.*, 2009a). En base a estas observaciones, sería relevante estudiar si el desensamblado de las

fibras de estrés inducido por la proteína Us3 de BoHV-5 se mantiene en el tiempo o, al igual que para MDV, es sólo transitorio.

El estudio de proteínas mutantes de Us3 con pérdida de la función de quinasa pone de manifiesto la relevancia de esta actividad enzimática en la reorganización del citoesqueleto de actina. Sin embargo, a diferencia de lo reportado para la mayoría de los alfa herpesvirus estudiados hasta el momento, las proteínas Us3 de MDV y BoHV-5 parecerían no requerir de su función de quinasa para inducir el desensamblado de las fibras de estrés. A pesar de esto, la función de quinasa de la proteína Us3 de BoHV-5 sería requerida para la inducción de proyecciones celulares. En conjunto, la información disponible actualmente resalta la diversidad de mecanismos por los cuales la proteína Us3 de los alfa herpesvirus induciría los rearrreglos del citoesqueleto. Además, los estudios realizados con proteínas Us3 de diversos alfa herpesvirus que carecen de actividad enzimática resaltan la importancia de los aminoácidos conservados en las serina-treonina quinasas, ya que la pérdida de la función de quinasa se obtuvo por mutaciones puntuales en posiciones aminoacídicas diferentes.

En este trabajo de tesis se observó que la proteína Us3K261D de BoHV-5 se localiza fuera del núcleo celular, en concordancia con lo reportado recientemente para la proteína Us3K220M de HSV-2 (Finnen *et al.*, 2009). Estos autores observaron que la mutación de la lisina correspondiente a la posición aminoacídica 220 de la proteína Us3 de HSV-2 produce una localización aberrante de esta proteína, encontrándose la proteína mutante excluida del núcleo celular (en el 60% de los casos). Por otra parte, la sustitución del ácido aspártico correspondiente a la posición aminoacídica 305 de la proteína Us3 de HSV-2 no produce esta localización aberrante.

En las proteínas mutantes Us3K261D de BoHV-5 y Us3K220M de HSV-2 se sustituyó una lisina por otro aminoácido, pero ni la lisina sustituida ni el aminoácido sustituyente son los mismos. En el caso de la proteína Us3K220M de HSV-2, la lisina mutada se encuentra en el subdominio II, involucrado en la unión del ATP, mientras que en la proteína Us3K261D de

BoHV-5, la lisina mutada se encuentra en el subdominio VIIb, que corresponde al sitio activo de la enzima. En cuanto a los aminoácidos sustituyentes, la mutación de la lisina 220 por metionina en la proteína Us3 de HSV-2 y de la lisina 261 por ácido aspártico en la proteína Us3 BoHV-5 resultó en una localización subcelular similar que difiere a la de la proteína Us3 *wt* de ambos virus. Sin embargo, la sustitución del ácido aspártico 305 por alanina no modificó la localización subcelular de la proteína Us3 de HSV-2.

La lisina conservada presente en el subdominio VIIb de las proteínas quinasas facilitaría la fosfotransferencia por neutralización de la carga negativa del fosfato gamma. Como se mencionó previamente, en la proteína Us3K261D de BoHV-5, la lisina 261 fue sustituida por ácido aspártico. A pH fisiológico este aminoácido se encuentra cargado negativamente y, a diferencia de la lisina, no podría neutralizar la carga negativa del fosfato. Resta dilucidar si es la presencia de un aminoácido cargado negativamente a pH fisiológico o la ausencia de la lisina conservada, la causa de la localización aberrante de la proteína Us3 de BoHV-5. Por otra parte, el ácido aspártico correspondiente a la posición aminoacídica 305 de la proteína Us3 de HSV-2 también se encuentra presente en el subdominio VIIb de las proteínas quinasas y es esencial para la actividad enzimática (Finnen *et al.*, 2009). Este aminoácido probablemente actúe como base catalítica, aceptando un protón a partir de un grupo hidroxilo donante durante la fosfotransferencia (Hanks *and* Hunter, 1985). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la proteína Us3D305A de HSV-2 carece de actividad de quinasa y no presenta una localización celular aberrante, la exclusión del núcleo observada para las proteínas Us3K220M de HSV-2 y Us3K261D de BoHV-5 no se debería a su pérdida de actividad catalítica. Finalmente, resultaría interesante estudiar si la sustitución de la lisina correspondiente al subdominio II de la proteína Us3 de BoHV-5 (K174) lleva a exclusión de esta proteína del núcleo, tal como ha sido observado con la proteína Us3K220M de HSV-2.

La multifuncionalidad de la proteína Us3 de los alfa herpesvirus requiere la localización de esta proteína en distintos compartimentos subcelulares, con lo cual, la exclusión de la proteína Us3K261D de BoHV-5 del núcleo celular observada en este trabajo de tesis podría afectar su función.

La proteína Us3 de PrV se localiza en el núcleo y en la mitocondria (Calton *et al.*, 2004; Van Minnebruggen *et al.*, 2003). Además, ha sido reportada la interacción de esta proteína con sustratos presentes tanto en el núcleo como en el citoplasma (Mou *et al.*, 2007; Munger and Roizman, 2001; Poon *et al.*, 2003; Van den Broeke *et al.*, 2009b). Las diferentes funciones llevadas a cabo por la proteína Us3 dependerían de su localización subcelular. En este aspecto, Van Minnebruggen *et al.* (2003) demostraron que la proteína Us3 de PrV, en ausencia de otras proteínas virales, es capaz de producir el desensamblado de las fibras de estrés sólo cuando se localiza en el núcleo. Por lo tanto, la habilidad de trasladarse entre el núcleo y el citoplasma sería de gran importancia para que la proteína Us3 ejerza su función.

La exclusión de la proteína Us3K261D de BoHV-5 del núcleo podría deberse a una inhibición en el transporte de esta proteína hacia el núcleo o a un incremento de la exportación de esta proteína desde el núcleo hacia el citoplasma. Las proteínas Us3 *wt* y Us3K261D de BoHV-5 utilizadas en los experimentos de transfección de esta tesis se encuentran fusionadas a ECFP, con lo cual su gran tamaño excluye la posibilidad de que ingresen al núcleo por difusión pasiva (van Leeuwen *et al.*, 2002). Sin embargo, no se detectaron *in silico* señales de localización nuclear sobre la secuencia primaria de la proteína Us3 de BoHV-5. Esto coincide con trabajos previos que reportan que las proteínas Us3 de PrV y HSV-2 carecen de una señal bipartita de localización nuclear (NLS) (Calton *et al.*, 2004; Finnen *et al.*, 2009; Minnbruggen *et al.*, 2005). Sin embargo, la proteína Us3 de PrV se localiza en el núcleo y se ha determinado que para ello requiere de secuencias no identificadas presentes en los 101 aminoácidos de su extremo N-terminal (Calton *et al.*, 2004). Esta información sugiere que la localización nuclear de la proteína Us3 podría deberse a la presencia de un NLS no convencional en su extremo N-terminal, o que esta proteína podría estar siendo transportada al núcleo por interacción con otras proteínas virales o celulares que presenten NLS.

La exportación de proteínas del núcleo hacia el citoplasma se encuentra mediada por señales de exportación nuclear (NES) ricas en leucina, cuya presencia ha sido reportada para la proteína Us3 de HSV-2 (Finnen *et al.*, 2009). En este aspecto, el análisis *in silico* de la proteína Us3 de BoHV-5 identificó dos posibles NES ricos en leucinas, comprendidos entre



las posiciones aminoacídicas 96 a 204 y 204 a 213. La exportación de proteínas del núcleo mediada por NES ricos en leucinas es sensible al tratamiento con leptomicina B (LMB). Por lo tanto, la funcionalidad de estos NES ricos en leucinas presentes en la proteína Us3 de BoHV-5 podría confirmarse mediante la adición de esta droga a células transfectadas con el plásmido pECFP-Us3K261D.

A diferencia de lo reportado para HSV-2 y de lo observado para BoHV-5, la proteína Us3 de PrV carece de NES. Asimismo, la localización subcelular aberrante observada con las proteínas Us3K220M de HSV-2 y Us3K261D de BoHV-5 no ha sido descrita para las proteínas mutantes Us3K136G y Us3D223A de PrV, sugiriendo que existirían diferentes mecanismos o requerimientos para la localización nuclear de la proteína Us3 de distintos alfa herpesvirus.

En conclusión, los experimentos realizados en esta tesis llevaron a la identificación de un aminoácido en la secuencia de la proteína Us3 (K261) que sería importante para el transporte de esta proteína entre el núcleo y el citoplasma. Además, se identificaron *in silico* dos posibles NES ricos en leucinas. Sin embargo, los experimentos realizados no nos permiten distinguir aún si la acumulación citoplasmática de la proteína Us3K261D se debería a un impedimento en la entrada al núcleo o a un incremento en la salida del mismo.

Los primeros estudios realizados para abordar el mecanismo por el cual la proteína Us3 induce las alteraciones morfológicas ya mencionadas, fueron realizados con la proteína Us3 de HSV-2 (Murata *et al.*, 2000). Estos autores demostraron que esta proteína, mediante su función de quinasa, actuaría como un supresor de la proteína quinasa JNK en la vía de señalización Cdc42/Rac, importante en la regulación del ensamblado y desensamblado de las fibras de estrés (Murata *et al.*, 2000). Recientemente, el mecanismo de acción de la proteína Us3 de PrV ha sido dilucidado (Van den Broeke *et al.*, 2009b). La proteína Us3 induce los rearreglos de actina a través de la fosforilación directa del grupo A de proteínas quinasas activadas por p21 (PAK). Las PAK son proteínas efectoras de las vías de señalización de las GTPasas Rho Cdc42 y Rac1 (Bokoch, 2003). Ha sido reportado que la activación de PAK 1 y

PAK 2 resulta en el desensamblado de las fibras de estrés y en la formación de proyecciones celulares (Zhao *et al.*, 1998; Sells *et al.*, 1997). Ambas proteínas se encuentran involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por PrV, siendo requerida la activación de PAK 1 y PAK 2 por Us3 para la inducción de proyecciones celulares y del desensamblado de las fibras de estrés, respectivamente (Van den Broeke *et al.*, 2009b).

Por otra parte, al infectar células con los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (*retroviridae*) y con el virus vaccinia (VV) (*poxviridae*) también se observa el desensamblado de las fibras de estrés y la formación de proyecciones celulares (Fackler *et al.*, 1999; Fackler and Krausslich, 2006; Greber and Way, 2006; Valderrama *et al.*, 2006;). Este proceso está mediado por las proteínas Nef (HIV) y F11L (VV), las cuales no presentan actividad de quinasa. A diferencia de esto, la proteína Us3 de PrV actúa a través de un mecanismo catalítico de desensamblado de las fibras de estrés y formación de proyecciones inducidas por virus. Siendo que virus diversos han desarrollado mecanismos diferentes para inducir rearreglos de actina, estos rearreglos podrían tener gran importancia en el ciclo de vida de los virus.

Actualmente, la mayoría de los compuestos antivirales utilizados contra herpesvirus tienen como blanco directo o indirecto a la enzima ADN polimerasa viral siendo su uso prolongado limitado debido a la aparición de cepas virales resistentes a los mismos (De Clercq, 2004). Por lo tanto, la identificación de proteínas virales involucradas en los rearreglos del citoesqueleto de actina, y por ende, en la dispersión y egreso de las partículas virales durante la infección, abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias antivirales.

Los resultados presentados en esta tesis brindan información sobre las propiedades replicativas *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5 y constituyen el primer reporte sobre la función de la proteína Us3 de BoHV-5. Esta información sirve de base para el desarrollo de nuevas líneas de investigación en nuestro grupo de trabajo tendientes a profundizar los conocimientos sobre BoHV-5.

## Conclusiones

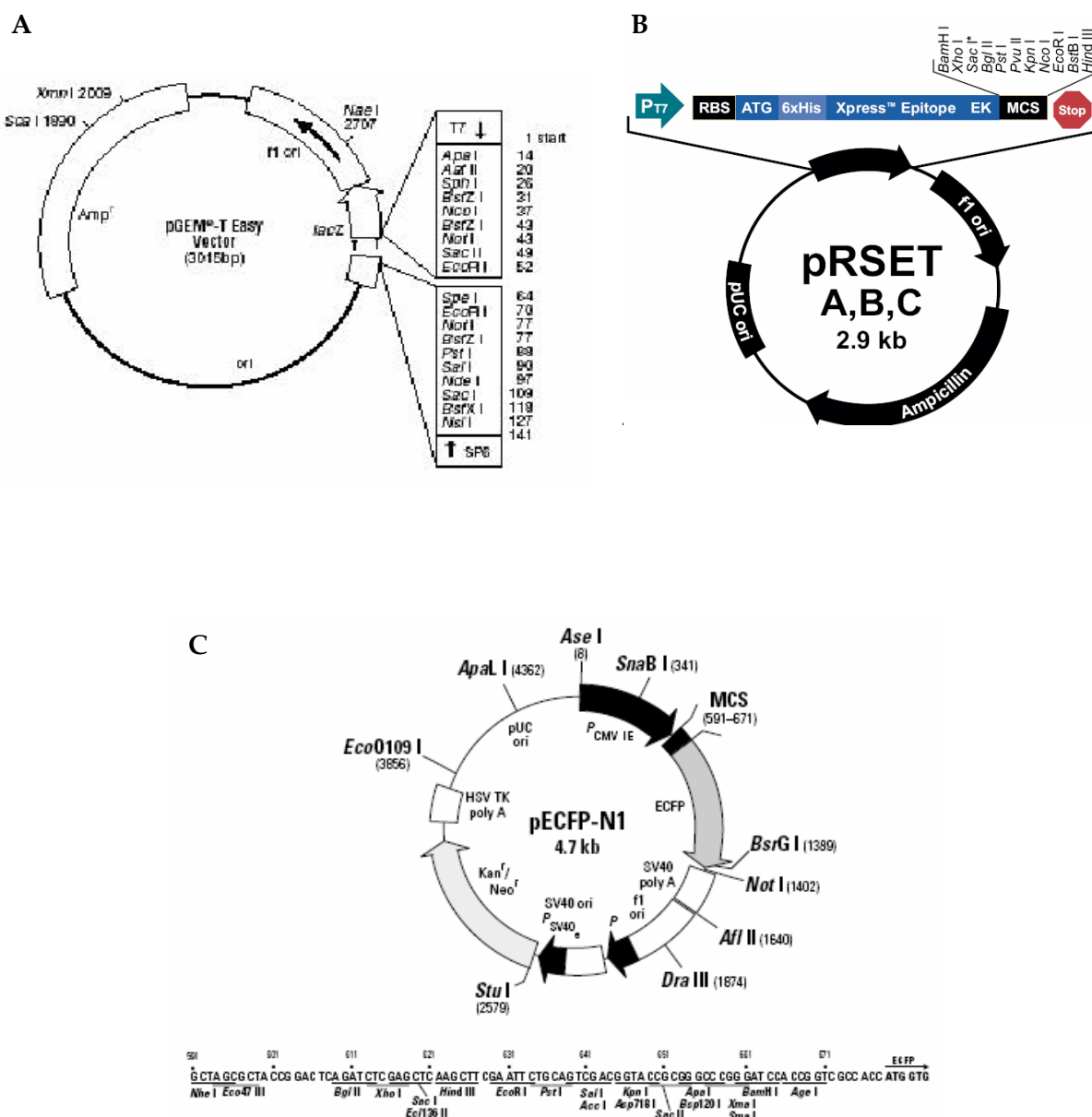
## Conclusiones

- La cepa A663 de BoHV-5 resultó menos eficiente en la liberación de partículas virales al medio extracelular y en la dispersión célula a célula que la cepa N569.
- La secuenciación del gen codificante para la proteína Us3 de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 constituye el primer dato genómico de estas cepas.
- El análisis *in silico* de las secuencias de la proteína Us3 de las cepas A663 y N569 de BoHV-5 determinó un dominio de proteína quinasa y un putativo sitio activo de serina/treonina quinasa.
- El *gen us3* se expresa temprana y prolongadamente a nivel transcripcional y proteico durante la replicación *in vitro* de la cepa A663 de BoHV-5.
- La proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5 indujo el redondeamiento celular, la formación de proyecciones de actina y provocó el desensamblado de las fibras de estrés.
- La formación de proyecciones de actina inducidas por la proteína Us3 de BoHV-5 depende de su actividad de quinasa, mientras que el redondeamiento celular y el desensamblado de las fibras de estrés serían independientes de esta función.
- La lisina correspondiente a la posición aminoacídica 261 de la proteína Us3 de BoHV-5 sería importante para la localización subcelular de dicha proteína.

## **Anexos**

## Anexo I. Plásmidos

Esquemas de los plásmidos utilizados para el clonado de los productos de amplificación por PCR (A), la expresión de proteínas en el sistema procariota (B) y la expresión de proteínas fusionadas a ECFP en el sistema eucariota (C).



## Anexo II. Condiciones de reacción y ciclado de PCR

Amplificación del gen <i>us3</i> de la cepa A663 de BoHV-5		
Templado	Ciclado	
ADN viral cepa A663	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
Oligonucleótidos  Us3-F y Us3-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 2 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 62°C, 1 min Elongación 72°C, 2 min.
Pares de bases amplificadas  1334	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del gen <i>us3</i> de la cepa N569 de BoHV-5		
Templado	Ciclado	
ADN viral cepa N569	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
Oligonucleótidos  Us3-F y Us3-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 2 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 62°C, 1 min Elongación 72°C, 2 min.
Pares de bases amplificadas  1377	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del fragmento Us3F1		
Templado	Ciclado	
ADN plasmídico: pGEM-Us3	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
<b>Oligonucleótidos</b> Us3F1-F y Us3F1-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 1 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 66°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
<b>Pares de bases amplificadas</b> 338	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del fragmento Us3F2		
Templado	Ciclado	
ADN plasmídico: pGEM-Us3	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
<b>Oligonucleótidos</b> Us3F2-F y Us3F2-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 1 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 66°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
<b>Pares de bases amplificadas</b> 353	Elongación final: 72°C 10 min.	



Amplificación del fragmento Us3f de la cepa A663 de BoHV-5		
Templado  ADN viral cepa A663	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
Oligonucleótidos  EcoRI-Us3f-F  BamHI-Us3f-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 1,5 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 62°C, 1 min Elongación 72°C, 1,5 min.
Pares de bases amplificadas  1348	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del fragmento Us3Nm de la cepa A663 de BoHV-5		
Templado  ADN viral cepa A663	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
Oligonucleótidos  EcoRI-Us3f-F  SalI-Us3m-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 65°C, 1 min * Elongación 72°C, 1 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 55°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas  789	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del fragmento Us3Cm de la cepa A663 de BoHV-5		
Templado	Ciclado	
ADN plasmídico: pGEM-Us3	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
<b>Oligonucleótidos</b>  SalI-Us3m-F  BamHI-Us3f-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 70°C, 1 min * Elongación 72°C, 1 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 57°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
<b>Pares de bases amplificadas</b>		
563	Elongación final: 72°C 10 min.	

Amplificación del gen gG de la cepa A663 de BoHV-5		
Templado	Ciclado	
ADN viral cepa A663	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
<b>Oligonucleótidos</b>  gG-F y gG-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 66°C, 1 min * Elongación 72°C, 2 min.
	30 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 58°C, 1 min Elongación 72°C, 2 min.
<b>Pares de bases amplificadas</b>		
1323	Elongación final: 72°C 10 min.	

\* Se indica la temperatura de hibridación del primer ciclo del ciclado tipo *touch down*.

### Anexo III. Predicción de fosforilaciones en la secuencia aminoacídica de la proteína Us3 de la cepa A663 de BoHV-5.

#### Predicciones en serinas

Pos	Contexto	Score	Pred
v			
30	AAEPSGEP	0.733	*S*
41	ERSRSRCGP	0.991	*S*
61	YSDVSDKGL	0.990	*S*
108	AQDASEGES	0.988	*S*
112	SEGESEGES	0.997	*S*
131	AGGVSREEA	0.996	*S*
154	LTPGSEGRV	0.810	*S*
301	LETNSPELL	0.970	*S*
340	APAVSRGED	0.988	*S*
377	GFPPSPTDR	0.990	*S*
391	QRHASARRE	0.994	*S*
398	REPRSPYPC	0.987	*S*
^			

#### Predicciones en treoninas

Pos	Context	Score	Pred
v			
102	EAAPTPAQD	0.722	*T*
151	DRRLTPGSE	0.994	*T*
181	ASASTLAEA	0.598	*T*
379	PPSPTDRLT	0.746	*T*
429	RARPTATEL	0.924	*T*
^			

#### Predicciones en tirosinas

Pos	Context	Score	Pred
v			
57	PADLYSDVS	0.963	*Y*
290	TEPRYYGLA	0.855	*Y*
^			

## **Bibliografía**

Ackermann, M. and Engels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 293-302.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K, Watson, J.D. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición, Omega, 1996.

Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L. and Canton C. (2001). African Swine fever virus proteína p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* **75**: 9819-9827.

Antinone, S.E., Shubeita, G.T., Collier, K.E., Lee, J.I., Haverlock-Moyns, S. and Smith, G.A. (2006). The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol* **80**: 5494-5498.

Antonsson, B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* **306** (3): 347-361.

Asano, S., Honda, T., Goshima, F., Nishiyama, Y. and Sugiura Y. (2000). Us3 protein kinase of herpes simplex virus protects primary afferent neurons from virus-induced apoptosis in IRC mice. *Neuroscience Letters* **294**: 105-108.

Ashbaugh, S.E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S., Collins, J.K., (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* **9**,387-394.

Ausubel, F. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.

Avitabile, E., Di Gaeta, S., Torrisi, M.R, Ward, P.L., Roizman, B., Campadelli-Fiume, G. (1995). Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol*. **69**(12):7472-82.

Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., y Tikoo, S. K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* **53**(1-2), 31-42.

Bataille, D., y Epstein, A. L. (1997). Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J Virol* **71** (10), 7736-43.

Bagust, T. J. (1972). Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol* **82** (4), 365-74.

- Bagust, T. J. y Clark, L. (1972). Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol* **82**(4), 375-83.
- Barenfus, M., Delli Quadri, C.A., McIntyre, R.W. y Schoeder, R.J. (1963). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J Am Vet Med Assoc* **143**, 725-728.
- Bartha, A., Hajdu, G., Aldasy, P. y Paczolay, G. (1969). Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet Acad Scient Hung* **19**, 145-151.
- Bataille, D., y Epstein, A. L. (1997). Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J Virol* **71**(10), 7736-43.
- Brack, A.R, Klupp, B.G., Granzow, H., Tirabassi, R., Enquist, L.W. and Mettenleiter, T.C (2000). Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* **74**: 4004-4016.
- Brack, A.R, Dijkstra, J.M., Granzow, H., Klupp, B.G. and Mettenleiter, T.C. (1999). Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol* **73**: 5364-5372.
- Brake, F. y Studert, M.J. (1985). Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust. Vet. J.* **62**, 331-334.
- Belák, K., Kucsera, L., Ros, C., Kulcsár, G., Makranszki, L., Soós, T., and Belák, S. (1999). Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **22**: 207-220.
- Benetti, L. and Roizman B. (2004). Herpes simplex virus protein kinase Us3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *PNAS* vol 101 **25**: 9411-9416.
- Benetti, L., Munger, J. and Roizman B. (2003). The herpes simplex virus 1 Us3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein Bad. *J Virol* **77** (11): 6567-6573.
- Bielefeldt Ohmann, H., Babiuk, L.A., y Harland, R. (1991) Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the pathogenesis of respiratory tract infection. *Clin Immunol Immunopathol* **60**, 153-157.

- Booy, F. P., Trus, B. L., Davison, A. J., y Steven, A. C. (1996). The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus. *Virology* **215**(2),134-41.
- Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**: 743-81.
- Brake, F. y Studert, M.J. (1985). Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust Vet J* **62**,331-334.
- Brzozwska, A., Rychtwoski, M., Lipinska, A, Bienkowska-Szewczyk, K. (2009). A point mutation in BoHV-1 Us3 gene abolishes its ability to induce cytoskeletal changes in various cell types. 3<sup>rd</sup> ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium.
- Calton, C. M., Randall, J. A., Adkins, M. W. and Banfield, B. W. (2004). The pseudorabies virus serine/threonine kinase Us3 contains mitochondrial, nuclear and membrane localization signals. *Virus Genes* **29**: 131-145.
- Campadelli-Fiume, G., Gocchi, F., Menotti, L. y Lopez, M. (2000a) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol* **10**, 305-19.
- Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S., y Roizman, B. (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **65** (3), 1589-95.
- Campos, M., Godson, D.L., Hughes, H.P.A. y Babiuk, L.A. (1994). Cytokine applications in infectious diseases. In: ed. B. Goddeeris y I. Morrisons. Cell-mediated immunity in ruminants. CRC Press. Boca Raton. Pp, 229-240.
- Carpenter, D.E., Misra, V. (1991).The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *J Gen Virol.* **72**(12): 3077-84.
- Carrillo, B.J., Pospischil, A. y Dahme, E. (1983a). Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *J Vet Med B* **30**,61-168.
- Carrillo, B.J., Ambrogí, A., Schudel, A.A., Vazquez, M., Dahme, E. y Pospischil, A., (1983b). Meningoencefalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *J Vet Med B* **30**: 327-332.
- Cartier, A. and Masucci M. G. (2004). Differential regulation of MHC class-I restricted and unrestricted cytotoxicity by the Us3 protein kinase of herpes simplex virus-1. *Scan J Immunol* **60**: 592-599.

Cartier, A., Broberg, E., Komai, T., Henrksson, M. and Masucci, M. G. (2003a). The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell death and Differentiation* **10**: 1320-1328.

Cartier, A., Komai, T. and Masucci, A. G. (2003b). The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp Cell Res* **291**: 242-250.

Cascio, K. E., Belknap, E. B., Schultheiss, P. C., Ames, A. D., y Collins, J. K. (1999). Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J Vet Diagn Invest* **11**(2), 134-9.

Chang, Y. E., Van Sant, C., Krug, P. W., Sears, A. E., and Roizman, B. (1997). The null mutant of the UL31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J Virol* **71**: 8307- 8315.

Chen, C., Weisz, O. A., Stolz, D. B, Watkins, S. C. and Montelaro, R. C. (2004). Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol* **78**: 882-891.

Colodel, E.M., Nakazato, L., Weiblen, R., Mello, R.M., Pinheiro da Silva, R.R., de Almeida Souza, M., Aguiar de Oliveira Filho, J. y Caron, L. (2002). Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciencia Rural, Santa Maria* **32**(2), 293-298.

Cooper, J. A. (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *The Journal of Cell Biology* (**105**): 1473-1478.

Daikoku, T., Yamashita, Y., Tsurumi, T., Maeno, K. and Nishiyama, Y. (1993). Purification and biochemical characterization of the protein kinase encoded by the Us3 gene of herpes simplex virus type 2. *Virol* **197**: 685-694.

D'Arce, R. C., Almeida, R. S., Silva, T. C., Franco, A. C., Spilki, F., Roehe, P. M., Arns, C. W. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* **88**(4), 315-24.

Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R. M., y Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**(Pt 1), 41-53.

Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**(1-2), 69-88.



- Davison, A. J., Dargan, D. J., y Stow, N. D. (2002). Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res* **56**(1), 1-11.
- Davison, A. J., y Davison, M. D. (1995). Identification of structural proteins of channel catfish virus by mass spectrometry. *Virology* **206**(2), 1035-43.
- Davison, A.J, McGeoch, D.J. (1986). Evolutionary comparisons of the S segments in the genomes of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus. *J Gen Virol*. **67**(4):597-611.
- De Clercq, E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* **30**:115–133.
- Delhon, G., Moraes, M. P., Lu, Z., Afonso, C. L., Flores, E. F., Weiblen, R., Kutish, G. F., Rock, D. L. (2003). Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol* **77**(19), 10339-47.
- Del Médico Zajac, M. P., Ladelfa, M. F., Kotsias, F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry, E., Romera, S. A. (2009a). Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.035.
- Del Médico Zajac, M. P., Puntel, M., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Romera, S. A. (2006). BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci* **81**(3):327-34.
- Deruelle, M., Geenen, K., Nauwynck, H. J. and Favoreel, H. W. (2007). A point mutation in the putative ATP binding site of the pseudorabies virus US3 protein kinase prevents Bad phosphorylation and cell survival following apoptosis induction. *Virus Res* **128**(1-2):65-70.
- Dingwell, K. S., Doering, L. C., y Johnson, D. C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J Virol* **69**(11), 7087-98.
- Dispas, M., Schynts, F., Lemaire, M., Letellier, C., Vanopdenbosch, E., Thiry, E., y Kerkhofs, P. (2003). Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. *Vet Rec* **153**(7), 209-12.
- Dohner, K. and Sodeik, B. (2004). The role of cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**: 67-108.
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Valle, R. and Sodeik, B. (2002). Function of dynein and dynactin in herpes virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**: 2795-2809.
- Donnelly, M., Verhagen, J. and Elliott, G. (2007). RNA binding by the herpes simplex virus type 1 nucleocytoplasmic shuttling protein UL47 is mediated by an N-terminal arginine-rich domain that also functions as its nuclear localization signal. *J Virol* **81**: 2283-2296.

- Dudnikova, E., Vlasov, A., Norkina, S., Kireev, D. and Witter, R. L. (2009). Factors influencing the attenuation of serotype 1 Marek's disease virus by serial cell culture passage and evaluation of attenuated strains for protection and replication. *Avian Dis.* **53** (1): 63-72.
- Elias, F., Schild, AnL., Riet-Correa, F. (2004) Menbingoencefalite e encefalomalacia por herpesvirus bovino-5: distribucao das lesoes no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq Vet Brasil* **24**(3), 123-131.
- Engelhardt, T. and Keil, G. M. (1996). Identification and Characterization of the Bovine Herpesvirus 5 US4 Gene and Gene Products. *Virology* **225**: 126-135.
- Engels, M., Giuliani, C., Wild, P., Beck, T. M., Loepfe, E., y Wyler, R. (1986). The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res* **6**(1), 57-73.
- Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W., y Smith, G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* **51**, 237-347.
- Eugster, A.K., Angulo, A.A. y Jones, L.P. (1974). Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* **17**, 267-281.
- Fackler, O. T. and Krausslich, H. G. (2006). Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Microbiol* **9**:409-415.
- Fackler, O. T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A. S., Peterlin, B. M. (1999). Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol Cell* **3**:729-739.
- Farnsworth, A., Goldsmith, K., Johnson, D.C. (2003). Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *J Virol.* **77**(15):8481-94.
- Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Van de Walle, G. R., Ficinska, J. and Nauwynck, H. J. (2006). Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: Bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies. *Vet Microbiol* **113**(3-4):257-63.
- Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D. and Nauwynck, H. (2005). Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the Us3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *PNAS* **102** (25): 8990-8995.

- Finnen, R. L., Roy, B. B., Zhang, H., Banfield, B. W. (2009). Analysis of filamentous process induction and nuclear localization properties of the HSV-2 serine/threonine kinase Us3. *Virology*, doi:10.1016/j.virol.2009.11.012.
- Forest, T., Barnard, S. and Baines, J. D. (2005). Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol* 7: 429-431.
- Forges, M., Difilippantonio, M. J., Linke, S. P., Ried, T., Nagashima, K. and Feden, J. (2003). Involvement of Cmr1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* 23: 5282-5292.
- Fraefel, C., Wirth, U.V., Vogt, B. and Schwyzer, M. (1993). Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the circ gene. *J Virol* 67:1328-1333.
- Frame, M. C., Purves, F. C., McGeoch, D. J., Marsden, H. S. and Leader, D. P. (1987). Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J Gen Virol* 68:2699-704.
- French, A.L. (1962). A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the casual agent. *Aus Vet J* 216-221.
- Friedli, K., y Metzler, A. E. (1987). Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch Virol* 94(1-2), 109-22.
- Fuchs, W., Klupp, B. G., Granznow, H. Osterrider, N. and Mettenleiter, T. C. (2002). The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host cell-nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* 76: 364-378.
- Garber, D. A., Beverley, S. M., Coen, D. M. (1993). Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1), 459-62.
- Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A. and Keen, J.H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1: 1-7.
- Gardiner, M.R., Nairn, M.E. (1964). Viral meningoencephalitis in calves in Western Australia. *Aust Vet J* 40,225-228.
- Geenen, K., Favoreel, H., Olsen, L., Enquist, L. W. and Nauwynck, H. J. (2005). The pseudorabies virus Us3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells

from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* **331**: 144-150.

Gerdts, V., Beyer, J., Lomniczi, B., and Mettenleiter, T. C. (2000). Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol* **74**(2), 817-27.

Gershburg, E and Pagano, J. S. (2008). Conserved herpesvirus protein kinases. *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 203–212.

Giraud, J. (1989). Descripción clínico-epidemiológica de casos de meningoencefalitis producidos por herpesvirus bovino en el período (1974-1988). *Therios* **13**, 287-293.

Gomes, L.I., Rocha, M.A., Costa, E.A., Lobato, I.P., Mendes, L.C.N., Borges, A.S., Leite, R.C. y Barbosa-Stancioli, E.F. (2002) Detecção de herpesvirus bovino 5 (BHV-5) em bovinos do sudoeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec* **54**(2), 217-220.

Gough, A. y James, D. (1975). Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencefalitis. *Can Vet J* **16**, 313–314.

Granzow, H., Klupp, B. G. and Mettenleiter, T. C. (2005). Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol* **79**:3200-3205.

Granzow, H., Klupp, B. and Mettenleiter, T. (2004). The pseudorabies virus Us3 protein is a component of primary and mature virions. *J Virol* **78** (3): 1314-1323.

Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., y Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**(8): 3675-84.

Greber, U. F. and Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell* **124**:741–754.

Griebel, P. J., Gee, A. P., Qualtiere, L., Lawman, M. J., y Babiuk, L. A. (1989). Negative enrichment of bovine T lymphocytes with monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Vet Immunol Immunopathol* **22**(2), 161-73.

Griebel, P. J., Qualtiere, L., Davis, W. C., Gee, A., Bielefeldt Ohmann, H., Lawman, M. J., y Babiuk, L. A. (1987). T lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus type-1 infection. *Viral Immunol* **1**(4), 287-304.

Gross, S.T., Harley, C.A. and Wilson D.W. (2003). The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* **317**:1-12.

- Halfen, D.C. y Vidor, T. (2000). Meningoencefalite por herpesvirus bovino tipo 5. p97-108. En: Riet-Correa, F, Schild, A.L., Mendez, M.C. y Lemos, R.A.A. (ed.) Doencas de ruminantes e equinos Vol 1 2ª ed. Editora Varela, Sao Paulo, SP.
- Hammerschmidt, W., Ludwig, H., and Buhk, H.J. (1988). Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J Virol* **62**(4), 1355-63.
- Hammerschmidt, W., Ludwig, H., y Buhk, H. J. (1988). Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J Virol* **62**(4), 1355-63.
- Hanahan, D. (1985) In: *DNA Cloning*, Vol. 1, Glover, D., ed., IRL Press, Ltd., 109.
- Hanks, S.K., Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hata, S., Koyama, A. H., Shiota, H., Adachi, A., Goshima, F. and Nishiyama, Y. (1999). Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of Us3 protein kinase gene. *Microbes and Infection* **1**: 601-607.
- Homa, F. L., and Brown, J. C. (1997). Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**(2), 107-122.
- Honess, R. W. and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral protein. *J Virol* **14**(1):8-19.
- Ishov, A. M., y Maul, G. G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134**(4), 815-26.
- Jacobsen, M. D., Weil Mand Raff, M. C. (1996). Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* **133** (5): 1041-1051.
- Jerome, K. R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A. E., Lee, H. and Corey, L. (1999). Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* **73** (11): 8950-8957.
- Joachims, M., K. C. Harris, and D. Etchison. 1995. Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* **211**:451–461.

- Johnston, L.A.Y., Simmons, G.C. y McGavin, M.D. (1962). A viral meningoencephalitis in calves. *Aust Vet J* **38**,207–215.
- Jouvenet, N. and Wileman, T. (2005). African swine fever virus infection disrupts centrosome assembly and function. *J Gen Virol* **86**: 589-594.
- Kalthoff, D., Granzow, H., Trapp, S. and Beer, M. (2008). The UL49 gene product of BoHV-1: a major factor in efficient cell-to-cell spread. *J Gen Virol* **89**:2269-2274.
- Kato, A., Tanaka, M., Yamamoto, M., Asai, R., Sata, T., Nishiyama, Y. and Kawaguchi, Y. (2008). Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *J Virol* **82** (13): 6172-6189.
- Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Kodaira, H., Nishiyama, Y. and Kawaguchi Y. (2005). Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol* **79** (14):9325-9331.
- Khan, S. M, Dauffenbach, L. M. and Yeh, J. (2000). Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **269** (2): 542-545.
- Klupp, B. G., Granzow, H., Keil, G. M., y Mettenleiter, T. C. (2006). The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* **80**(13), 6235-46.
- Klupp, B., Granzow, H., Klopffleisch, R., Fuchs W., Kopp, M., Lenk, M. and Thomas C. Mettenleiter, T. (2005). Functional Analysis of the Pseudorabies Virus UL51 Protein. *J Virol* **79** (6): 3831–3840.
- Klupp, B. G., Granzow, H. and Mettenleiter, T. C. (2001). Effect of the pseudorabies virus Us3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* **82**: 2363-2371.
- Klupp, B. G., Granzow, H. and Mettenleiter, T. C. (2000). Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* **74**: 10063-100-73.
- Kopp, M., Granzow, H., Fuchs, W., Klupp, B. and Mettenleiter, T.C. (2004). Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol* **78**: 3024-3034.

- Koppers-Lalic, D., Rijsewijk, F. A., Verschuren, S. B., van Gaans-Van den Brink, J. A., Neisig, A., Rensing, M. E., Neefjes, J., and Wiertz, E. J. (2001). The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* **82**(Pt 9), 2071-81.
- Labiuk, S. L., Lobanov, V., Lawman, Z., Snider, M., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2009). Bovine Herpesvirus-1 US3 Protein Kinase: Critical Residues and Involvement in the Phosphorylation of VP22. *J Gen Virol*, doi:10.1099/vir.0.016600-0.
- La Boissière, S., Izeta, A., Malcomber, S. and O'Hare, P. (2004). Compartmentalization of VP16 in cells infected with recombinant herpes simplex virus expressing VP16-green fluorescent protein fusion proteins. *J Virol* **78**(15): 8002-14.
- Ladelfa, M.F., Del Médico Zajac, M.P., Kotsias, F., Romera, S.A, Calamante, G. (2006). Construcción de vectores de transferencia para la obtención de herpesvirus bovino 5 recombinantes. XXVI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Virología. Valle Hermoso, Córdoba, 22- 25 de Octubre de 2006.
- Lee, H.C., Chouljenko, V.N, Chouljenko, D.V., Boudreaux, M.J. and Kousoulas, K.G. (2009). The herpes simplex virus type 1 glicoprotein D (gD) cytoplasmic terminus and full-length gE are not essential and do not function in a redundant manner for the cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol* **83**: 6115-6124.
- Leege, T., Fuchs, W., Granzow, H., Kopp, M., Klupp, B.G. and Mettenleiter, T.C.(2009). Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **83**: 896-907.
- Lehmann, M. J., Sherer, N.M., Marks, C.B., Pypaert, M. and Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filipodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* **170**: 317-325.
- Leopardi, R., Van Sant, C. and Roizman, B. (1997). The herpes simplex virus protein kinase Us3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (15): 7891-7896.
- Leung-Tack, P., Audonnet, J. C. and Riviere, M. (1994). The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). *Virol* **199**: 409-421.
- Leuzinger, H., Ziegler, U., Schraner, E. M., Fraefel, C., Glauser, D. L., Heid, I., Ackermann, M., Mueller, M., y Wild, P. (2005). Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**(20), 13047-59.

- Li, Y., van Drunen Littel-van der Hurk, S., Babiuk, L.A and Liang, X. (1995). Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J Virol* **69**: 4758-4768.
- Liang, X., Chow, B., Raggo, C., and Babiuk, L. A. (1996). Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol* **70**(3), 1448-54.
- Liang, X., Pyne, C., Li, Y., Babiuk, L.A. and Kowalski, J. (1995). Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology* **207**: 429-441.
- Liang, X., Babiuk, L. A. and Zamb, T.J. (1993). Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* **194**: 233-243.
- Liang, X., Babiuk, L., and Zamb, T. (1992). An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* **189**(2), 629-39.
- Liman, A., Engels, M., Meyer, G. and Ackermann, M. (2000). Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. *Arch Virol* **145**: 2047-2059.
- Lu, X., Wu, X., Plemenitas, A., Yu, H., Sawai, E. T., Abo, A., Peterlin, B. M. (1996). CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef associated kinase and replication of HIV-1. *Curr Biol* **6**: 1677-1684.
- Mahoney, T. (2009). Bovine herpesvirus: what is missing from our understanding of the relationship between BoHV-1 and BoHV-5? *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.06.020.
- Mars, M. H., de Jong, M. C., van Maanen, C., Hage, J. J. y van Oirschot, J. T. (2000) Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol* **76**,1-13.
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M. and Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159**: 441-452.
- McGeoch, D. J. and Davison, A. J. (1986). Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Research* **4** (14): 1765-1777.



- McGeoch, D. J., Dolan, A. y Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol* **74**(22), 10401-6.
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E. y Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**(3), 443-58.
- Mechor G.D., Gröhn Y.T., Van Saun R.J. (1991). Effect of temperature on colostrometer readings for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *J Dairy Sci.* **74**(11):3940-3.
- Mechor, G.D., Rousseaux, C.G., Radostits, O.M., Babiuk, L.A. y Petrie, L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can J Vet Res* **51**(4), 452-9.
- Mettenleiter, T.C. (2006a). Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 163-9.
- Mettenleiter, T.C. and Minson, T. (2006b). Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* **80**(3), 1610-1; author reply 1611-2.
- Mettenleiter, T.C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**(2), 167-80.
- Mettenleiter, T.C. (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* **92**,197-206.
- Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**(4), 1537-47.
- Metzler, A.E., Schudel, A.A. and Engels, M. (1986). Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol* **87**(3-4), 205-17.
- Meyer, G., Lemaire, M., Ros, C., Belak, K., Gabriel, A., Cassart, D., Coignoul, F., Belak, S. y Thiry, E. (2001). Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol* **146**(4), 633-52.
- Meyer, G., Hanon, E., Georlette, D., Pstoret, P.P. and Thiry, E. (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol* **79**: 1983-1987.

- Moore, P.S., Gao, S.J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D.M., Garber, R., Pellett, P.E., McGeoch, D.J. and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* **70**(1), 549-58.
- Moretti, B., Orfei, Z., Mondino, G. and Persechino, A., (1964). Infectious bovine rinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. *Vet Ital* **15**,676.
- Mou, F., T. Forest, and J.D. Baines (2007). US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol*. **81**:6459–6470.
- Munger, J., Roizman, B. (2001). The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (18), 10410–10415.
- Muranyi, W., Haas, J., Wagmer, M., Krohne, G. and Koszinowski, U.H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297** : 854-857.
- Murata, T., Goshima, F., Nishizawa, Y., Daikoku, T., Takakuwa, H., Ohtsuka, K., Yoshikawa, T. and Nishiyama, Y. (2002). Phosphorylation of cytokeratin 17 by herpes simplex virus type 2 Us3 protein kinase. *Microbiol Immunol* **46**(10): 707-719.
- Murata, T., Goshima, F., Daikoku, T., Takakuwa, H. and Nishiyama, Y. (2000). Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N terminal kinase activation. *Genes to cells* **5** : 1017-1027.
- Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F. and Thiry, E. (2003) Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. *Virologie* **7**, 401-15.
- Nakamichi, K., Matsumoto, Y. and Otsuka, H. (2002). Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein G Is Necessary for Maintaining Cell-to-Cell Junctional Adherence among Infected Cells. *Virol* **294**: 22-30.
- Nigro, O., Yu, G., Aguirre, A. A. and Lu, Y. (2004). Sequencing and characterization of the full-length gene encoding the single-stranded DNA binding protein of a novel Chelonian herpesvirus. *Arch Virol* **149**(2), 337-47.
- Ogg, P. D., McDonell, P. J., Ryckman, B. J., Knudson, C. M. and Roller, R. J. (2004). The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* **319**: 212-224.

- Okazaki, K., Honda, E. and Kono, Y. (1994). Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. *Arch Virol* **134**:413-419.
- Okazaki, K., Kanno, T., Kiriya, S., Honda, E. and Kono, Y. (1993). Hemadsorptive activity of transfected COS-7 cells expressing BHV-1 glycoprotein gIII. *Virology* **193**: 1024-1027.
- Okazaki, K., Matsuzaki, T., Sugahara, Y., Okada, J., Hasebe, M., Iwamura, Y., Ohnishi, M., Kanno, T., Shimizu, M. and Honda, E. (1991). BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* **181**: 666-670.
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G. and Marsh, M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**: 310-316.
- Pelkmans, L., Puntener, D. and Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535-539.
- Perez, S.E., Vagnozzi, A., Sur, J.H., Odriozola, E., Campero, C.M. y Odeón, A.C. (2003). Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Rev Arg Microbiol* **35**, 69-73.
- Perez, S.E., Bretschneider, G., Leunda, M.R., Osorio, E.A., Flores, E.F. and Odeon, A. C. (2002). Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol* **39**(4), 437-44.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E. and Jacob, Y. (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* **116**: 3433-3442.
- Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I., Gonzalez, C. and Way, M. (2000). Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *EMBO J* **19**: 3932-3944.
- Poon, A.P. and Roizman, B. (2005). Herpes simplex virus 1 ICP22 regulates the accumulation of a shorter mRNA and of a truncated Us3 protein kinase that exhibits altered functions. *J of Virol* **79** (13): 8470-8479.
- Poon, A. P. W., Y. Liang, and B. Roizman. (2003). Herpes simplex virus 1 gene expression is accelerated by inhibitors of histone deacetylases in rabbit skin cells infected with a mutant carrying a cDNA copy of the infected-cell protein no. 0. *J. Virol.* **77**:12671-12678.

Purves, F.C., Longnecker, R. M., Leader, D. P. and Roizman, B. (1987). Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *J Virol* **61**(9):2896-901.

Quackenbush, S.L., Work, T.M., Balazs, G.H., Casey, R.N., Rovnak, J., Chaves, A., duToit, L., Baines, J.D., Parrish, C.R., Bowser, P.R. and Casey, J.W. (1998). Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* **246**(2), 392-9.

Rea, T.J., Timmins, J.G., Long, G.W. and Post, L.E. (1985). Mapping and sequence of the gene of pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J Virol* **54**: 21-29.

Rebordosa, X., Pifiol, J., Pérez-Pons, J.A., Lloberas, J., Naval, J., Serra-Hartmann, X., Espufia, E. and Querol, E. (1996). Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Research* **45**: 59-68.

Reed, C.J. and Muench, H.A. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* **27**,493.

Reed, D.E., Bicknell, E.J. and Bury, R.J. (1973). Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. *J Am Vet Med Ass* **163**,753-755.

Renkema, G.H., Manninen, A., Mann, D. A., Harris, M., Saksela, K. (1999) Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol* **9**:1407-1410.

Reske, A., Pollara, G., Krummenacher, C., Chain, B.M. and Katz, D.R. (2007). Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* **17**: 205-215.

Reynolds, A.E., Liang, L. and Baines, J.D. (2004). Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**: 5564-5575.

Reynolds, A., Wills, E. G., Roller, R. J., Ryckman, B. J. and Baines, J. D. (2002). Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 from a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**: 8803-8817.

Riet-Correa, F., Vidor, T., Schild, A.L., Mendez, M.C. (1989). Meningoencefalite e necrose do cortex cerebral em bovinos causadas por herpes virus bovino-1. *Pesq Bras* **9**, 13-16.

Riet-Correa, G., Dutra Duarte, M., Barbosa, J.D., Chaves Oliveira, C.M., Duarte Cerqueira, V., de Farias Brito, M., Riet-Correa, F. (2006). Meningoencefalite e poliencfalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq Vet Brasil* **26**(1), 44-46.

- Rijsewijk, F.A., Verschuren, S.B., Madic, J., Ruuls, R.C., Renaud, P., van Oirschot, J.T. (1999). Spontaneous BHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region. *Arch Virol* **144**(8), 1527-37.
- Rissi, D.R., Oliveira, F.N., Rech, R.R., Pierezan, F., Lemas, R.A.A., Barros, C.S.L. (2006). Epidemiología, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesq Vet Brasil* **26**(2): 123-132.
- Rixon, F. J. and McGeoch, D. J. (1985). Detailed analysis of the mRNAs mapping in the short unique region of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res* **13**: 953-973.
- Roizman, B. and Pellet, P. E. (2007). The family Herpesviridae: a brief introduction. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, T.P. Monath, J.L. Melnick, B. Roizman and S.E. Straus, Editors, *Fields Virology* (fourth ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2007), pp. 2480–2499.
- Roizman, B. and Pellet, P. E. (2001). The family herpesviridae: a brief introduction. De: Fields. *Virology* 4ta edición. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Roizman, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C. y Studdert, M.J. (1992) The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol.* **123**, 425-449.
- Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* **16**(3):481-94.
- Roizman, B., Keller, J. M., Spear, P. G., Terni, M., Nahmias, A. and Dowdle, W. (1970). Variability, structural glycoproteins, and classification of herpes simplex viruses. *Nature* **19**;227(5264):1253-4.
- Roller, R., Zhou, Y., Schnetzer, R., Ferguson, J. and DeSalvo, D. (2000). Herpes simplex virus type 1 UL34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**: 117-129.
- Romera, S. A., Hilgers, L. A., Puntel, M., Zamorano, P. I., Alcon, V. L., Dos Santos, M. J., Blanco Viera, J., Borca, M. V. y Sadir, A. M. (2000). Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalene-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine* **19**(1), 132-41.
- Roos, W.H., Radtke, K., Kniesmeijer, E., Geertsema, H., Sodeik, B. and Wuite, G.J. (2009). Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:9673-9678.

- Rosette, C. and Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274** (5290): 1194-1197.
- Rouse, B.T. y Babiuk, L.A. (1974). Host defense mechanism against infectious bovine rhinotracheitis virus: in vitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. *Infect. Immunity* **10**,681–687
- Roux, P. P. and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (68) 2: 320–344.
- Sagou K., Imai T., Sagara H., Uema M., Kawaguchi Y. (2009). Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J Virol* **83**(11):5773-83.
- Salvador, J.C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehe, P.M. y Osorio, A.R. (1998). Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e Sao Paulo. *Pesq Vet Brasil* **18**(2), 75-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, H., Nakamura, M., Ohno, T., Matsuda, Y., Yuda, Y. and Nonomura, Y. (1995). Myosin-actin interacton play san important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2026-2030.
- Schudel, A.A., Carrillo, B.J., Wyler, R. y Metzler, A.E. (1986). Infections of claves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. *J Vet Med B* **33**,303–310.
- Schumacher, D., McKinney, C., Kaufer, B.B. and Osterrieder, N. (2008). Enzymatically inactive U(S)3 protein kinase of Marek's disease virus (MDV) is capable of depolymerizing F actin but results in accumulation of virions in perinuclear invaginations and reduced virus growth. *Virology* **37**: 69–80.
- Schumacher, D., Tischer, B.K., Trapp, S. and Osterrieder, N. (2005). The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J Virol* **79**: 3987–3997.
- Schynts, F., Meurens, F., Muylkens, B., Epstein, A., McVoy, M. and Thiry E. (2002) Réplication, clivage-encapsidation et recombinaison de l'ADN des herpèsvirus. *Virologie* **6**:343-352.

- Scorrano, L. and Korsmeyer, S.J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304** (3): 25865-25869.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M., Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**:202-210.
- Severini, A., Scraba, D. G., y Tyrrell, D. L. (1996). Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70** (5), 3169-75.
- Shukla, D., Dal Canto, M. C., Rowe, C. L. y Spear, P. G. (2000). Striking similarity of murine nectin-1alpha to human nectin-1alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *J Virol* **74**(24), 11773-81.
- Spear, P.G., Manoj, S., Yoon, M., Jogger, C.R., Zago, A and Myscowski, D. (2006). Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology* **344**:17-24.
- Spear, P. G. and Longnecker, R. (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**(19), 10179-85.
- Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., Elton, D., McCauley, J. and Digard, P. (2002). A functional link between the actin cytoskeleton and the lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**: 212-225.
- Sloan, D. D., Zahariadis, G., Posavad, C. M., Pate, N., Kussick, S. J. and Jerome, K. R. (2003). CTL are inactivated by herpes simplex virus infected cells expressing a viral protein kinase. *The Journal of Immunology* **171**: 6733-6741.
- Smith, G.A. and Enquist, L.W. (2002). Break ins and break out: viral interactions with the cytoskeleton of mammalian cells. *Annu Cell Dev Biol* **18**: 135-161.
- Smith, C.C., J. Nelson, L. Aurelian, M. Gober, and Goswami, B. B. (2000). Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *J. Virol.* **74**:10417-10429.
- Spear, P. G., Eisenberg, R. J. and Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**(1), 1-8.
- Spear, P. G. (1993). Membrane fusion induced by herpes simplex virus. P 201-232. In J Bentz (ed.), *Viral fusion mechanisms*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Fla.

Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R. P. and Greber, U. F. (1999). Microtubule-dependent plus- and minus-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* **144**: 657-672.

Takashima, Y., Tamura, H., Xuan, X. and Otsuka, H. (1999). Identification of the Us3 gene product of BHV-1 as a protein kinase and characterization of BHV-1 mutants of the Us3 gene. *Virus research* **59**: 23-34.

Terry-Allison, T., Montgomery, R. I., Whitheck, J. C., Xu, R., Cohen, G. H., Fisenberg, R. J. and Spear, P. G. (1998). HvcA (herpesvirus entry mediator A), a coreceptor for herpes simplex virus entry, also participates in virus-induced cell fusion. *J Virol* **72**: 5802-5810.

Theil, D., Paripovic, I., Derfuss, T., Herberger, S., Strupp, M., Arbusow, V., and Brandt, T. (2003). Dually infected (HSV-1/VZV) single neurons in human trigeminal ganglia. *Ann Neurol* **54**(5), 678-82.

Une, Y., Murakami, M., Uemura, K., Fujitani, H., Ishibashi, T. and Nomura, Y. (2000). Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of herpesvirus in tortoises. *J Vet Med Sci* **62**(8), 905-7.

Van den Broeke, C., Deruelle, M., Nauwynck, H. J., Coller, K. E., Smith, G. A., Van Doorselaere, J. and Favoreel, H. W. (2009a). The kinase activity of pseudorabies virus US3 is required for modulation of the actin cytoskeleton. *Virol* **385** (2009): 155-160.

Van den Broeke, C., Radu, M., Deruelle, M., Nauwynck, H., Hofmann, C., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. and Favoreel, H. W. (2009b). Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *PNAS* **106** (21): 8707-8712.

van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2006). Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 275-82.

van Drunen Littel-van der Hurk, S., Garzon, S., van den Hurk, J.V., Babiuk, L.A., and Tijssen, P. (1995). The role of the major tegumento proteína VP8 of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. *Virology* **206**: 413-425.

Van Minnebruggen, G., Favoreel, H., Jacobs, L. and Nauwynck, H. J. (2003). Pseudorabies virus Us3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol* **77** (16): 9074-9080.

Valderrama, F., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Frischknecht, F., Way, M. (2006) Vaccinia virus induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* **311**: 377-381.



- Vogel, F. S., Caron, L., Flores, E. F., Weiblen, R., Winkelmann, E. R., Mayer, S. V. and Bastos, R. G. (2003). Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol* **41**(10), 4512-20.
- Wallin, M., J. Deinum, L. Goobar, and Danielson, U. H. (1990). Proteolytic cleavage of microtubule-associated proteins by retroviral proteinases. *J. Gen. Virol.* 71:1985–1991.
- Weir, J. P. (1998). Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes* **16**(1), 85-93.
- Whetstone, C. A. and Miller, J. M. (1989). Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* **107**(1-2), 27-34.
- Whittaker, G. R. (2003) Virus nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* **55**: 733-747.
- Whittaker, G. R. and Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genome. *Virology* **246**: 1-23.
- Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E. M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M. and Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**(2), 1071-83.
- Wisner, T.W., Wright, C.C., Kato, A., Kawaguchi, Y., Mou, F., Baines, J.D., Roller, R.J., Johnson, D.C. (2009). Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* **83**(7):3115-26.
- Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K., and Itzhaki, R. F. (2005). Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J Med Virol* **75**(2), 300-6.
- Ye, G. J., Vaughan, K. T., Vallee, R. B. and Roizman, B. (2000). The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* **74**(3), 1355-63.
- Yu, Q., Hu, N., Lu, Y., Nerurkar, V.R. and Yanagihara, R. (2001). Rapid acquisition of entire DNA polymerase gene of a novel herpesvirus from green turtle fibropapilloma by a genomic walking technique. *J Virol Methods* **91**(2), 183-95.
- Yun, C., Cho, H., Kim, S.J., Lee, J.H., Park, S.Y., Chan, G.K. and Cho, H. (2004). Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X

oncoprotein via the ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res* **2**: 159-169.

Zhao, Z.S., Manser, E., Chen, X.Q., Chong, C., Leung, T., Lim. L. (1998) A conserved negative regulatory region in alphaPAK: Inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* **18**:2153–2163.

Zhang, G., Stevens, R. and Leader, D.P. (1990). The protein kinase encoded in the short unique region of pseudorabies virus: description of the gene and identification of its product in virions and in infected cells. *J Gen Virol* **71**: 1757-65.

Zhen, C., Brownlie, R., Babiuk, L.A and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2004). Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. *Virology* **324**: 327-339.